การสังเคราะห์ คุณลักษณะและการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารประกอบเชิงซ้อนของเหล็ก(III)-เหล็ก(II)และเหล็ก(III)-สังกะสี(II)กับลิแกนด์พอลีเดนเตท

โดย

อานอบ คันฑะชา

วรรณฤดี หิรัญรัตน์

ปริชาติ เทพทอง

สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยทักษิณ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

งบประมาณเงินแผ่นดิน ประจำปี 2555

มหาวิทยาลัยทักษิณ

คำรับรองคุณภาพ

รายงานวิจัยเรื่อง การสังเคราะห์คุณลักษณะและการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารประกอบเชิงซ้อนของเหล็ก(III)-เหล็ก(II)และเหล็ก(III)-สังกะสี(II)กับลิแกนด์พอลีเดนเตรท

ผู้วิจัย อานอบ คันฑะชา วรรณฤดี หิรัญรัตน์ และปริชาติ เทพทอง

สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยทักษิณ ขอรับรองว่ารายงานวิจัยฉบับนี้ได้ผ่านการประเมินจากผู้ทรงคุณวุฒิแล้ว มีความเห็นว่าผลงานวิจัยฉบับนี้มีคุณภาพอยู่ในเกณฑ์

- ☐ ดีมาก
- ☑ ดี
- ☐ ปานกลาง
- ☐ พอใช้
- ☐ ควรปรับปรุง

.....

(อาจารย์ ดร.ธนพันธุ์ ปัทมานนท์)

รองผู้อำนวยการสถาบันวิจัยและพัฒนา

วันที่ 22 เดือน กรกฎาคม พ.ศ. 2557

โครงการวิจัยเรื่อง การสังเคราะห์ คุณลักษณะและการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารประกอบเชิงซ้อนของเหล็ก(III)-เหล็ก(II) และเหล็ก(III)-สังกะสี(II) กับลิแกนด์พอลีเดนเตท

บทคัดย่อ

สังเคราะห์ลิแกนด์มัลติเดนเตต H_2L เมื่อ H_2L คือ 2-[(Bis-pyridin-2-ylmethyl-amino)-methyl]-6-{[(2-hydroxy-benzyl)-(4-imidazol-1-yl-butyl)-amino]-methyl}-4-methyl-phenol และสังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อน M_1M_2L ได้ใช้สารตั้งต้นซึ่งเป็นเกลือของเหล็ก(III) และ เหล็ก(II) สำหรับสารประกอบเชิงซ้อน **1** และเหล็ก(III) และสังกะสี(II) สำหรับสารประกอบเชิงซ้อน **2** ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ผลจากการศึกษาสมบัติทางเคมีและตรวจหาลักษณะโครงสร้างของสารประกอบเชิงซ้อน **1** และ **2** โดยวิธีทางสเปกโทรสโกปี เช่น ฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรด สเปกโทรสโกปี วิเคราะห์หามวลโมเลกุลด้วยเครื่องลิควิด โครมาโทกราฟี แมสสเปกโทรมิเตอร์ โดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายและทำให้เกิดการแตกตัวเป็นไอออนด้วยวิธี Electro spray ionization และอัลตราไวโอเลต - วิสิเบิลสเปกโทรสโกปี เป็นต้น พบว่า สารประกอบเชิงซ้อนทั้งสองชนิดมีสูตรโมเลกุลเป็น $[Fe^{III}Fe^{II}(L)(\mu\text{-}O)(H_2O)_2](ClO_4)\cdot H_2O$ **(1)**, $[Fe^{III}Zn^{II}(L)(\mu\text{-}O)(H_2O)](ClO_4)$ **(2)** ซึ่งสารประกอบเชิงซ้อนทั้งสองชนิดมีรูปทรงทางเรขาคณิตแบบทรงเหลี่ยมแปดหน้ารอบอะตอมของโลหะ Fe(III) และโลหะ Fe(II) ยกเว้นรูปทรงพีระมิดฐานสี่เหลี่ยมรอบอะตอมของโลหะ Zn(II) นอกจากนี้ยังได้ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารประกอบเชิงซ้อนดังกล่าวเทียบกับลิแกนด์ โดยแบคทีเรียชนิดแกรมบวก คือ *S. aureus* และแบคทีเรียแกรมลบ คือ *E. coli* ทำการเก็บข้อมูลการยับยั้งเชื้อดังกล่าวโดยการวัดขนาดของโซนใสซึ่งเป็นบริเวณที่แบคทีเรียไม่มีการเจริญเติบโต ผลจากการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแสดงให้เห็นว่าสารประกอบเชิงซ้อนทั้งสองชนิดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดที่ดีกว่าลิแกนด์ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกันและผลยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเทียบกับยามาตรฐานเตตระซัยคลิน พบว่า ที่ความเข้มข้นสูง ๆ สารประกอบเชิงซ้อนทั้งสองชนิดให้ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียใกล้เคียงกับยามาตรฐานเตตระซัยคลิน

คำสำคัญ : ลิแกนด์พอลีเดนเตต สแตปฟิโลคอคคัส ออเรียส เอสเชอริเชีย โคไล ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

Research title : Synthesis, Characterization and Antibacterial Activity of Iron(III) – Iron(II) and Iron(III) – Zinc(II) Complexes with a Polydentate Ligand

Abstract

2-[(Bis-pyridin-2-ylmethyl-amino)-methyl]-6-{[(2-hydroxy-benzyl)-(4-imidazol-1-yl-butyl)-amino]-methyl}-4-methyl-phenol (H_2L), which is a multipolydentate ligand and cationic complexes of $[M_1M_2L(\mu\text{-}O)(H_2O)_2]^+$ have been synthesized (where M_1M_2 are Fe(III)-Fe(II) for complex **1** and Fe(III)-Zn(II) for complex **2**) and L is the anion of 2-[(Bis-pyridin-2-ylmethyl-amino)-methyl]-6-{[(2-hydroxy-benzyl)-(4-imidazol-1-yl-butyl)-amino]-methyl}-4-methyl-phenol. The reaction was set up at temperature 60 °C. Both complexes were studied the physical and chemical properties and have been characterized using FT-IR, LC-MS with methanol solvent and UV-Vis techniques. Molecular formula of two complexes is $[Fe^{III}Fe^{II}(L)(\mu\text{-}O)(H_2O)_2](ClO_4)\cdot H_2O$ (**1**) and $[Fe^{III}Zn^{II}(L)(\mu\text{-}O)(H_2O)](ClO_4)$ (**2**). The Fe centers are coordinated in octahedral form except the expectedly molecular shape around Zn(II) is square pyramid. The complexes and a multidentate ligand were tested for *in vitro* antibacterial activity against Gram-positive bacteria, *S.aureus* and Gram-negative bacteria, *E.coli*. The antibacterial activity was assessed by measuring the growth inhibition zones diameters. As a result, both complexes possess superior antibacterial activity than only multidentate ligand as the same concentration. An antibacterial effect is compared to tetracycline. It was found that two complexes have more concentration, the antibacterial activity is closed to tetracycline.

Keywords : Polydentate ligand; *S. aureus; E. coli*; Antibacterial activity

คำนำ

สารประกอบเชิงซ้อน M_1M_2L ได้ใช้สารตั้งต้นซึ่งเป็นเกลือของเหล็ก(III) และเหล็ก(II) สำหรับสารประกอบเชิงซ้อน **1** และเหล็ก(III) และสังกะสี(II) สำหรับสารประกอบเชิงซ้อน **2** เมื่อ L = ไอออนลบของ 2-[(Bis-pyridin-2-ylmethyl-amino)-methyl]-6-{[(2-hydroxy-benzyl)-(4-imidazol-1-yl-butyl)-amino]-methyl}-4-methyl-phenol โดยสารที่สังเคราะห์ได้มีการนำมาศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารประกอบเชิงซ้อนดังกล่าวเทียบกับลิแกนด์ โดยแบคทีเรียที่ใช้ชนิดแกรมบวกที่ใช้ คือ *S. aureus* และแบคทีเรียแกรมลบ คือ*E. coli* พบว่า สารประกอบเชิงซ้อนมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดที่ดีกว่าลิแกนด์ ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนการสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ งบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2555

อานอบ คันฑะชา

สิงหาคม 2557

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัย เรื่อง การสังเคราะห์ คุณลักษณะและการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารประกอบเชิงซ้อนของเหล็ก(III)-เหล็ก(II) และเหล็ก(III)-สังกะสี(II) กับลิแกนด์พอลิเดนเตท ในครั้งนี้ผู้วิจัยได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ 2555 จึงขอขอบคุณ มา ณ ที่นี้ด้วย

ขอขอบคุณ สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ ที่สนับสนุนให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ เครื่องมือทางด้านการวิเคราะห์ และห้องปฏิบัติการเคมีและสารเคมีบางชนิดสำหรับใช้ในทำโครงการวิจัยในครั้งนี้

รวมทั้งขอขอบคุณ คุณสุรชัย คงชู และคุณสิรินาฏ ชูเศษที่มีส่วนร่วมช่วยเหลือและอุทิศเวลาให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สารบัญ

บทที่		หน้า
1	**บทนำ**	1
	- ความสำคัญของการศึกษา	1
	- วัตถุประสงค์ของการศึกษา	3
	- ขอบเขตของการศึกษา	3
	- นิยามศัพท์เฉพาะ	4
2	**เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**	6
	- เอกสาร	6
	- งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	11
3	**วิธีดำเนินการวิจัย**	14
	- วัสดุ และอุปกรณ์	14
	- สารเคมี	14
	- เครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์	16
	- ตอนที่ 1 สังเคราะห์ลิแกนด์และสารประกอบเชิงซ้อนเหล็กและสังกะสี	16
	- ตอนที่ 2 ศึกษาสมบัติทางกายภาพ และเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี	18
	- ตอนที่ 3 ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของลิแกนด์และสารประกอบเชิงซ้อนที่สังเคราะห์ได้	18
4	**ผลการวิเคราะห์ข้อมูล**	21
	- ตอนที่ 1 ปฏิกิริยาการโดยรวมในการสังเคราะห์ลิแกนด์	21
	- ตอนที่ 2 ผลการศึกษาสมบัติทางกายภาพ และเทคนิคสเปกโทรสโกปี	22
	- ตอนที่ 3 ผลการศึกษาประสิทธิภาพของลิแกนด์และสารประกอบเชิงซ้อนที่สังเคราะห์ได้ ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย	33
5	**สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ**	37
	- สรุปผลการศึกษา	37
	- อภิปรายผลการศึกษา	38
	- ข้อเสนอแนะ	47
บรรณานุกรม		48

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	สมบัติทางกายภาพของสารประกอบเชิงซ้อน	22
2	สมบัติการละลายของสารประกอบเชิงซ้อน	22
3	ข้อมูลอินฟราเรดของสารประกอบ 2,6-bis(chloromethyl)-4-methyl phenol	23
4	ข้อมูลอินฟราเรดของสารประกอบ 2-[(3-pyrazol-l-yl-propylamino)-methyl]-phenol	24
5	ข้อมูลอินฟราเรดของสารประกอบ 2,2'-Dipicolamine	24
6	ข้อมูลอินฟราเรดของสารประกอบ 2-[(Bis-pyridin-2-ylmethyl-amino)-methyl]-6-{[(2-hydroxy-benzyl)-(4-imidazol-1-yl-butyl)-amino]-methyl}-4-methyl-phenol	25
7	ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *S. aureus* ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ	34
8	ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *E. coli* ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ	34

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ตำแหน่งที่จะวางแผ่นกระดาษตาปลาขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร.....	20
2	การสังเคราะห์ลิแกนด์ H_2L ใช้สารเคมี คือ 2-[(3-pyrazol-l-yl-propylamino)-methyl]-phenol (1) 2,6-bis(chloromethyl)-4-methyl phenol (2) และ 2,2'-Dipicolamine (3).....	21
3	สเปกตรัม FT-IR ของสารประกอบ 2,6-bis(chloromethyl)-4-methyl phenol.....	26
4	สเปกตรัม FT-IR ของสารประกอบ 2-[(3-pyrazol-l-yl-propylamino)-methyl]-phenol.....	27
5	สเปกตรัม FT-IR ของสารประกอบ 2,2'-Dipicolamine.....	28
6	สเปกตรัม FT-IR ของสารประกอบ 2-[(Bis-pyridin-2-ylmethyl-amino)-methyl]-6-{[(2-hydroxy-benzyl)-(4-imidazol-1-yl-butyl)-amino]-methyl}-4-methyl-phenol.....	29
7	แสดงสเปกตรัม mass ของสารประกอบเชิงซ้อน $[Fe^{III}Fe^{II}(L)(\mu\text{-}O)(H_2O)_2](ClO_4)\cdot H_2O$.....	30
8	แสดงสเปกตรัม mass ของสารประกอบเชิงซ้อน $[Fe^{III}Zn^{II}(L)(\mu\text{-}O)(H_2O)](ClO_4)$ (2).....	31
9	สเปกตรัม UV ของสารประกอบเชิงซ้อน $[Fe^{III}Fe^{II}(L)(\mu\text{-}O)(H_2O)_2](ClO_4)\cdot H_2O$ (1)	32
10	สเปกตรัม UV ของสารประกอบเชิงซ้อน $[Fe^{III}Zn^{II}(L)(\mu\text{-}O)(H_2O)](ClO_4)$ (2).....	33
11	ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ของสารประกอบเชิงซ้อน **1** และ **2**	34
12	ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ของสารประกอบเชิงซ้อน **1** และ **2**.....	34

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญของการศึกษา

ถึงแม้ว่าในปัจจุบันนี้ วิทยาการทางด้านการแพทย์และสาธารณสุขจะก้าวหน้าไปมาก แต่ความเป็นพิษของอาหารซึ่งได้จากการปนเปื้อนสารเคมี โลหะหนัก ปรสิต เชื้อรา และเชื้อแบคทีเรีย ก็ยังเป็นภาวะที่พบได้บ่อยและสร้างปัญหาไม่น้อย ซึ่งเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาหารเป็นพิษที่พบบ่อยที่สุด ได้แก่ *Staphylococcus aureus, Salmonella, Clostridium perfringens, Campylobacter, Listeria monocytogenes, Vibrio parahaemolyticus, Bacillus cereus, Entero-pathogenic* และ *Escherichia coli* เป็นต้น

ส่วนสาเหตุการทำงานผิดปกติของสารประกอบเชิงซ้อนโลหะคู่ในร่างกาย เกิดขึ้นจากการไฮโดรไลซ์ที่เกี่ยวข้องกับเมทัลโลเอนไซม์ หากการทำงานผิดปกติก็จะก่อให้เกิดโรคต่าง ๆ ขึ้นได้ โรคที่อาจจะเกิดขึ้นได้นี้ได้แก่โรคมะเร็งชนิดต่าง ๆ โดยที่โปรตีน ADAMs (A Disintegrin and Metalloproteinase) เป็นไกลโคโปรตีนที่พบในยูคาริโอต เป็นเอนไซม์ที่ออกฤทธิ์ที่ภาวะเป็นกลาง และอาศัยไอออนสังกะสีในการทำงาน ตลอดจนโรค Alzheimer และ Arthritis เป็นต้น สำหรับธาตุสังกะสีเป็นส่วนประกอบที่สำคัญในเมทัลโลโปรตีนช่วยรักษารูปร่างของโปรตีนไว้ โดยทำงานในกระบวนการสำคัญของร่างกายหลากหลายกระบวนการ เช่น ทำงานเป็นเอนไซม์ที่ช่วยในกระบวนการเผาผลาญ การสร้างฮอร์โมนบางชนิด กระบวนการถอดรหัสสารพันธุกรรม ไปจนถึงการเก็บสะสมสารต่าง ๆ ที่ร่างกายต้องการ หากร่างกายปราศจากแร่ธาตุ เช่น สังกะสี เมทัลโลโปรตีนจะไม่ทำงาน ส่งผลให้เกิดภาวะภูมิคุ้มกันอ่อนแอ ทำให้เป็นโรคติดเชื้อง่าย รูปร่างแคระแกร็น เป็นต้น นอกจากนี้การทำงานผิดปกติของสารประกอบเชิงซ้อนโลหะคู่ในร่างกายก่อให้เกิดโรคกระดูกพรุน โรคทางเดินหายใจ และโรคจิต

มีคณะนักวิจัยหลายคณะที่ได้นำลิแกนด์และสารประกอบเชิงซ้อนของลิแกนด์ที่สังเคราะห์ได้ไปศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย และได้ศึกษาสมบัติในทางจลนศาสตร์ของเอนไซม์ ซึ่งโครงการวิจัยนี้จะคล้ายคลึงกับงานวิจัยของคณะผู้วิจัยอื่น ดังนี้

สารประกอบเชิงซ้อนของ Fe และ Co ที่มี norfloxacin (NFL) เป็นลิแกนด์ มีสูตรเคมีเป็น $[M(NFL)_2(H_2O)_2]Cl_3 \cdot 6H_2O$ (เมื่อ M = Fe, Co) และ $[Zn(NFL)_2]Cl_3 \cdot 7H_2O$ พบว่า สารประกอบเชิงซ้อนของ Fe(III) และ Zn(II) ให้ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียชนิด *E. coli* และ *B. dysenteriae* ได้ดีกว่า norfloxacin (Gao และคณะ. 2008) และ Zn(II) ที่มี 4-methoxy-2-5(5-H/Me/Cl/NO_2-1H-benzimidazol-2-yl)-phenols (HLx; x = 1-4) ได้นำลิแกนด์และสารประกอบเชิงซ้อนทั้ง 4 ชนิด หาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย 9 ชนิด พบว่าสารประกอบเชิงซ้อนทุกชนิดยกเว้น $[Zn(L_1)(H_2O)_2]NO_3$ และ HL_4 ให้ฤทธิ์การต้านแบคทีเรียชนิด *S. aureus* ได้ (Tavman และคณะ. 2008) ได้สังเคราะห์ Bis-5-benzoyl-1-[(2-hydroxy-5-methyl-benzylidene)-amino]-4-

phenyl-1H-pyrimidin-2-one (HL) และสารประกอบเชิงซ้อน Ni(II), Co(II), Fe(II) และ Cu(II) เพื่อนำไปศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ATCC 6538, *S. aureus* ATCC 25923, *B. cereus* ATCC 7064, *C. krusei* ATCC 6258 และ *C. parapsilosis* ATCC 22019 พบว่า ทั้งลิแกนด์ HL และสารประกอบเชิงซ้อนของลิแกนด์ HL สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตเชื้อแบคทีเรียทั้งในกลุ่มแกรมบวกและแกรมลบได้ อยู่ในช่วงความเข้มข้น 20-320 µg/mL และยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้อยู่ในช่วงความเข้มข้น 20-160 µg/mL (Sönmez และคณะ. 2010) ได้สังเคราะห์ลิแกนด์ 2,3–bis(2-pyridyl)pyrazine(2,3-dpp) และสารประกอบเชิงซ้อน $[Ag(2,3\text{-dpp})(NO_3)]_2$ **(1)** และ $[Cd(2,3\text{-dpp})(NO_3)]_n$ **(2)** ไปศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *E. coli, B. cereus, S. typhi* และ *S. aureus* พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวได้ในระดับที่ต่ำ (Zhou และคณะ. 2010) สังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนของ Co(II), Ni(II), Fe(II), Mn(II) และ Zn(II) ที่มี quinoliny sulfonamides เป็นลิแกนด์ได้ถูกสังเคราะห์ขึ้น พบว่า สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียชนิด *E. coli* (Huang และคณะ. 2006) สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กกับ Uteroferrin ที่มี Fe(III)/Fe(II) เป็นโลหะคู่ พบว่ามีสีชมพูและมีสมบัติเป็นเมทัลโลเอนไซม์ (Guddat และคณะ. 1999 และ Twitchett และคณะ. 1999) สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กที่เกิดคล้ายกับสารดังกล่าว ได้แก่ สารประกอบเชิงซ้อนที่มี Fe(III)/Fe(II) ทำหน้าที่เป็นตำแหน่งที่ว่องไวต่อปฏิกิริยา (Active site) ของโลหะเอนไซม์ชนิด Pig Purple Acid Phosphatase และนำ Mn(II), Ni(II), Cu(II) และ Zn(II) ไปแทนที่โลหะคู่ที่ตำแหน่ง Fe(II) ศึกษาการไฮโดรไลซ์กับฟอสเฟต (Twitchett และคณะ. 2002) นักวิจัยคณะอื่นได้สังเคราะห์ $[Fe_4(\mu\text{-btppnol})_2(\mu\text{-O})_2(\mu\text{-OAc})_2](BPh_4)_2\cdot CH_3CN(H_2O)½(MeOH)½$ ก็เพื่อใช้เป็นแบบจำลองสำหรับพอลีนิวเคลียร์ของเหล็กเอ็นไซม์ (Horn และคณะ. 2001) ตลอดจนมีนักวิจัยกลุ่มอื่นได้สังเคราะห์ $[Fe^{III}Fe^{II}(BBPMP)(\mu\text{-OAc})_2]ClO_4\cdot 2H_2O$ และ $Fe^{III}Fe^{II}(BBPMP)(\mu\text{-OAc})(\mu\text{-OH})ClO_4$ เพื่อใช้เป็นแบบจำลอง Fe(III)/Fe(II) ทำหน้าที่เป็น active site ของ Purple Acid Phosphatases (Neves และคณะ. 1996) คณะวิจัยกลุ่มอื่นได้สังเคราะห์ $[Fe_2O(L)_2(H_2O)](ClO_4)_2$ และ $Fe_2O(L)(BzO)]ClO_4$ (L= หมู่คาร์บอกซิลเลต) จำลองเลียนแบบธรรมชาติ ซึ่งเป็นต้นแบบของ active site ของโปรตีนในร่างกายมนุษย์ชนิดอะตอมเหล็กคู่ และสามารถเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทั่ว ๆ ไปได้ (Trukhan และคณะ. 2000) ได้สังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนโลหะคู่ Fe^{III}/Zn^{II} กับลิแกนด์ 2- bis{[(2-pyridylmethyl)-aminomethyl]-6-[2-hydroxy-benzyl)(2-pyridylmethyl)]aminomethyl}-4-methylphenol เพื่อนำมาศึกษาความเป็น active site (Smith และคณะ. 2008) ในทำนองเดียวกันมีสารประกอบตัวอื่นที่ทำหน้าที่เป็น active site ได้แก่ $[Zn_2(HL_1)(CH_3COO)](PF_6)\cdot H_2O$ และ $Li[Zn_2(HL_1)]_4(PO_4)_2(PF_6)_3\cdot(CH_3OH)$ (Rebecca และคณะ. 2008) มีสารประกอบเชิงซ้อนชนิดอื่น ๆ เช่น $[Cu_2(BPMP)(OAc)_2](ClO_4)\cdot xH_2O$ ซึ่งโลหะคู่ของทองแดง ได้ทำหน้าที่เป็น active site (เมื่อ HBPMP = 2,6-bis[bis(pyridin-2-ylmethylamino)methyl]-4-methylphenol) : (Smith และคณะ. 2008) และมีสารประกอบเชิงซ้อนโลหะคู่อื่น ๆ เช่น $[Fe^{III}Co^{II}(BPBPMP)(\mu\text{-OAc})_2][ClO_4]$ และ $[Ga^{III}Co^{II}(BPBPMP)(\mu\text{-OAc})_2](ClO_4)$ ซึ่งได้นำมาศึกษาการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซ์กับซับสเตรตชนิด

bis(2,4-dinitrophenyl)phosphate พบว่าสารประกอบเชิงซ้อนทั้ง 2 ชนิดนี้ ทำหน้าที่เป็น active site ได้ (เมื่อ H_2BPBPMP คือ (2-bis[{(2-pyridyl-methyl)-aminomethyl}-6-{(2-hydroxy-benzyl)-(2-pyridyl-methyl)}-aminomethyl]-4-methylphenol) : (Xavier และคณะ. 2009) ตลอดจน Kantacha, A. และคณะ. 2011 ได้สังเคราะห์สารประกอบเตตระเมอร์ของเหล็ก $[Fe_4(HPBA)_2(\mu\text{-}CH_3COO)_2(\mu\text{-}O)(\mu\text{-}OH)(OH_2)_2]ClO_4 \cdot 5H_2O$ พบว่า สารนี้ทำหน้าที่เป็น active site ของ Purple acid phosphatase (PAP) ได้และเป็นคะตะลิสต์ได้อย่างดีเมื่อใช้ 2,4-bis(dinitrophenylphosphate) เป็นซับสเตรท

จะเห็นได้ว่า สารประกอบเชิงซ้อนโลหะคู่ที่สังเคราะห์ขึ้นดังที่กล่าวมา ส่วนใหญ่มีโลหะคู่ชนิด $Fe^{III}Fe^{II}$, $Fe^{III}Zn^{II}$, $Fe^{III}Co^{II}$, $Ga^{III}Zn^{II}$ และ $Ga^{III}Co^{II}$ เป็นบริเวณ active site ซึ่งทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาของโปรตีนได้ ดังนั้นในโครงการวิจัยนี้จะสังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนโลหะคู่ที่มีลิแกนด์เป็นแบบพอลิเดนเตท ซึ่งคาดว่าเป็นโลหะเอนไซม์ชนิดหนึ่งที่ทำหน้าที่เป็นเมทัลโลเอนไซม์ของโปรตีนได้ และจะนำลิแกนด์ H_2L และสารประกอบเชิงซ้อนของ Fe(III)-Fe(II)L และ Fe(III)-Zn(II)L ไปศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ดังนั้นการวิจัยนี้จะได้นำสารที่สังเคราะห์ได้คือ H_2L และสารประกอบเชิงซ้อน Fe(III)-Fe(II)L และ Fe(III)-Zn(II)L ไปทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อสังเคราะห์ลิแกนด์ H_2L และสารประกอบเชิงซ้อน M_1M_2L
2. เพื่อศึกษาสมบัติทางกายภาพและเคมีของสารประกอบเชิงซ้อน M_1M_2L และตรวจหาลักษณะโครงสร้างของสารประกอบโลหะเชิงซ้อน M_1M_2L ด้วยวิธีสเปกโทรสโกปี
3. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของ H_2L และสารประกอบเชิงซ้อน M_1M_2L ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียชนิด *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* โดยวิธี Disc diffusion
4. เพื่อศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสาร H_2L และ M_1M_2L (เมื่อ H_2L = ลิแกนด์ 2-[(Bis-pyridin-2 -ylmethyl-amino)-methyl]-6 -{[(2 -hydroxy-benzyl)-(4 -imidazol-1 -yl-butyl)-amino]-methyl}-4 -methyl-phenol, L = ไอออนลบของลิแกนด์ 2-[(Bis-pyridin-2-ylmethyl-amino)-methyl]-6-{[(2-hydroxy-benzyl)-(4-imidazol-1-yl-butyl)-amino]-methyl}-4-methyl-phenol และ $M_1M_2 = Fe^{III}Fe^{II}$ และ $Fe^{III}Zn^{II}$

ขอบเขตของโครงการวิจัย

การวิจัยประกอบเป็น 3 ส่วน คือ ส่วนที่ 1 การสังเคราะห์ H_2L โดยการทำปฏิกิริยาดังนี้ สารตั้งต้นซาลิซิลแอลดีไฮด์ ทำปฏิกิริยากับ 1-(3-อะมิโนโพรพิล)อิมิดาโซล ได้สารประกอบ 2-[(3-pyrazol-1-yl-propylamino)-methyl]-phenol **(1)** จากนั้นเตรียม 2,6-bis(chloromethyl)-4-methyl phenol **(2)** จากการทำปฏิกิริยาระหว่าง 2,6-bis(hydroxymethyl)-4-methyl phenol และกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น และเตรียม 2,2'-

Dipicolamine (3) จากการทำปฏิกิริยาระหว่าง 2-(Aminomethyl)pyridine และ 2-Pyridine carboxaldehyde จากนั้นนำสารประกอบที่เตรียมได้ทั้งสามชนิดมาทำปฏิกิริยากันจะได้สารประกอบ 2-[(Bis-pyridin-2-ylmethyl-amino)-methyl]-6-{[(2-hydroxy-benzyl)-(4-imidazol-1-yl-butyl)-amino]-methyl}-4-methyl-phenol (H_2L) ซึ่งเป็นลิแกนด์ที่ต้องการแล้วทำ ให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟฟี ตลอดจนตรวจหาลักษณะโครงสร้างของลิแกนด์ที่บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค NMR ส่วนที่ 2 การสังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อน M_1M_2L โดยนำลิแกนด์ H_2L มาทำปฏิกิริยากับเกลือของ M_1M_2, CH_3COONa และ $NaClO_4$ จะได้สารประกอบเชิงซ้อน M_1M_2L (เมื่อ $M_1M_2 = Fe^{III}Fe^{II}$ และ $Fe^{III}Zn^{II}$) จากนั้นนำสารประกอบเชิงซ้อน M_1M_2L ไปศึกษาสมบัติกายภาพ ทางเคมี และตรวจหาลักษณะโครงสร้างโมเลกุลของสารประกอบเชิงซ้อนด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปี เช่น IR, UV-Visible และ Mass Spectrophotometry และส่วนสุดท้ายศึกษาประสิทธิภาพของ H_2L และสารประกอบเชิงซ้อน M_1M_2L ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียชนิด *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* โดยวิธี Disc diffusion

นิยามศัพท์เฉพาะ

1. ลิแกนด์ หมายถึง อะตอม ไอออน หรือฟังก์ชันนัลกรุป (Functional group) ที่สามารถจะเชื่อมต่อกับ อะตอม หรือไอออนกลาง ซึ่งโดยทั่วไปจะเป็นโลหะด้วยพันธะโคออร์ดิเนตโคเวเลนต์

2. ลิแกนด์มอนอเดนเตท (Monodentate ligand) หมายถึง ลิแกนด์ที่เชื่อมต่ออะตอมกลางหนึ่งตำแหน่ง

3. ลิแกนด์พอลิเดนเตท (Polydentate ligand) หมายถึง โมเลกุลหรือไอออนลบที่สามารถเชื่อมต่อกับไอออนของโลหะได้หลายที่เพราะว่ามีคู่อิเล็กตรอนว่างอิสระมากกว่า 1 อะตอม

4. ลิแกนด์พอลิเดนเตท หมายถึง H_2L = 2-[(Bis-pyridin-2-ylmethyl-amino)-methyl]-6-{[(2-hydroxy-benzyl)-(4-imidazol-1-yl-butyl)-amino]-methyl}-4-methyl-phenol

5. L หมายถึง ไอออนลบของลิแกนด์2-[(Bis-pyridin-2-ylmethyl-amino)-methyl]-6-{[(2-hydroxy-benzyl)-(4-imidazol-1-yl-butyl)-amino]-methyl}-4-methyl-phenol anion

6. M_1M_2L (เมื่อ $M_1M_2 = Fe^{III}Fe^{II}$ และ $Fe^{III}Zn^{II}$)

7. สารประกอบเชิงซ้อน หมายถึง สารเชิงซ้อนหรือเกลือของสารเชิงซ้อน

8. แบคทีเรีย เป็นประเภทของสิ่งมีชีวิตประเภทหนึ่ง มีขนาดเล็ก มองด้วยตาเปล่าไม่เห็น ส่วนใหญ่มีเซลล์เดียว และมีโครงสร้างเซลล์ที่ไม่ซับซ้อนมาก

9. การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย หมายถึง หยุด หรือตรวจสอบการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย

10. การตรวจหาลักษณะโครงสร้างของสารด้วยวิธีสเปกโทรสโกปี หมายถึง ใช้เทคนิคอินฟราเรด (IR), อัลตราไวโอเลต และวิสิเบิล สเปกโทรสโกปี (UV–Vis) และแมสสเปกโทรเมตรี (MS) เพื่อยืนยันลักษณะโครงสร้างของสารประกอบเชิงซ้อนที่สังเคราะห์ได้

11. เทคนิคทางสเปกโทรสโกปี (Spectroscopy Technique)

ฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์ม อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) เทคนิคทางด้านอินฟราเรด สเปกโทรสโกปีเป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์ตรวจสอบเกี่ยวกับโมเลกุลของสาร โดยอาศัยหลักการเกี่ยวกับการสั่นของโมเลกุลแสงอินฟราเรดช่วงกลาง (2.5-25 ไมโครเมตร) มีความถี่ตรงกับความถี่ของการสั่นของพันธะโควาเลนซ์ในโมเลกุลของสารเมื่อสารตัวอย่างได้รับพลังงานจากคลื่นรังสีอินฟราเรดที่พอเหมาะจะเกิดการสั่นของโมเลกุลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงค่าโมเมนต์ขั้วคู่ (Dipole Moment) ของโมเลกุลทำให้โมเลกุลเกิดการดูดกลืนแสงแล้ววัดแสงที่ส่งผ่านออกมาแสดงผลเป็นความสัมพันธ์ของความถี่หรือ Wavenumber กับค่าการส่งผ่านของแสง (%T) เรียกว่า IR สเปกตรัมลักษณะสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารแต่ละชนิดจะมีคุณสมบัติเฉพาะโมเลกุลของสสารจึงสามารถดูดกลืนแสงอินฟราเรดได้ที่ความถี่ต่างกันขึ้นอยู่กับความแข็งแรงของพันธะและน้ำหนักของอะตอมของหมู่ฟังก์ชันในโมเลกุลนั้น ๆ (Thumanu และคณะ. 2009)

12. พันธะโคออร์ดิเนชัน (Coordination bond)

พันธะโคออร์ดิเนชัน หมายถึง พันธะระหว่างลิแกนด์กับโลหะอะตอมกลาง โดยที่ลิแกนด์จะใช้คู่อิเล็กตรอนสร้างพันธะกับโลหะ พันธะโคออดิเนชันจัดเป็นพันธะโคเวเลนต์ เพราะใช้อิเล็กตรอนร่วมกันในการสร้างพันธะแต่ละอะตอมที่มีสัมพรรคภาคอิเล็กตรอนสูงกว่าหรือมีความหนาแน่นของอิเล็กตรอนมากกว่าจะให้อิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวแก่อะตอมที่มีสัมพรรคภาคอิเล็กตรอนต่ำกว่า แล้วอะตอมที่ให้อิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวไปแสดงประจุบวก (Esmarch, S. G.1958 : 232)

13. ยูวี - วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (UV-Vis spectrophotometer)

เป็นเครื่องมือที่ใช้ในวิเคราะห์สาร โดยอาศัยหลักการดูดกลืนรังสีของสารที่อยู่ในช่วงอัลตราไวโอเลต (UV) และไวโอเลต (Vis) ที่มีความยาวคลื่นอยู่ในช่วง 190-1000 nm ส่วนใหญ่เป็นสารอินทรีย์ หรือสารอนินทรีย์ ทั้งที่มีสีและไม่มีสี สารแต่ละชนิดจะดูดกลืนรังสีในช่วงความยาวคลื่นที่แตกต่างกันและปริมาณการดูดกลืนรังสีก็ขึ้นอยู่กับความเข้มของสารนั้น สามารถวิเคราะห์ได้ในเชิงคุณภาพและปริมาณ เป็นเทคนิคที่ให้สภาพไวที่ดี และใช้กันอย่างแพร่หลาย

14. แมสสเปกโตรเมทรี (Mass spectrometry)

คือ การวิเคราะห์ผลสัดส่วนมวลต่อประจุ (*m/z*) ของอนุภาคที่มีประจุใช้เพื่อระบุมวลของอนุภาค ส่วนประกอบของธาตุในสารประกอบตัวอย่างหรือในโมเลกุล และเพื่อแสดงถึงโครงสร้างทางเคมีของโมเลกุล

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การสังเคราะห์ คุณลักษณะและการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารประกอบเชิงซ้อนของเหล็ก(III)-เหล็ก(II) และสังกะสี(III)-สังกะสี(II) กับลิแกนด์พอลิเดนเตท มีเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ดังนี้

การจำแนกประเภทจุลินทรีย์

เป็นการจัดประเภทของจุลินทรีย์สิ่งสำคัญจะต้องรู้จักลักษณะเฉพาะของจุลินทรีย์นั้น ซึ่งจะต้องศึกษาจากจุลินทรีย์ชนิดเดียว โดยศึกษาเป็นกลุ่มของจุลินทรีย์นั้น ๆ คือ เป็นกลุ่มเชื้อ (Culture) เพราะว่าจุลินทรีย์มีขนาดเล็กมากเมื่อศึกษาเป็นกลุ่มเชื้อแล้วก็เท่ากับศึกษาจุลินทรีย์ชนิดเดียว กลุ่มที่ประกอบด้วยจุลินทรีย์ชนิดเดียวเป็นเชื้อบริสุทธิ์ (Pure Culture) ลักษณะที่สำคัญของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษาเพื่อจัดจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ ได้แก่

1. ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological Characteristics) โดยดูจากขนาด รูปร่าง โครงสร้างของเชื้อจุลินทรีย์ เนื่องจากแต่ละเซลล์มีขนาดเล็กมากมีหน่วยเป็นไมโครเมตร การศึกษาต้องใช้กล้องจุลทรรศน์ที่มีกำลังขยายประมาณ 1,000 เท่า

2. องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ (Chemical Composition) เซลล์ของจุลินทรีย์นั้นจะประกอบด้วยสารอินทรีย์แตกต่างกันมากมาย เช่น มีลิโพพอลิแซ็กคาไรด์ ที่ผนังเซลล์เป็นลักษณะของแบคทีเรียแกรมลบ แต่แบคทีเรียแกรมบวกไม่มี หรือแบคทีเรียแกรมบวกมีสารกรดไทโคอิก (Teichoic acid) ที่ผนังเซลล์ซึ่งแบคทีเรียแกรมลบไม่มีผนังเซลล์

3. ลักษณะของการเลี้ยงเชื้อ (Cultural Characteristics) จุลินทรีย์บางชนิดต้องการสารอาหารแตกต่างกัน บางชนิดเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการ บางชนิดเลี้ยงในอาหารที่มีแต่สารอนินทรีย์ บางชนิดต้องการสารอินทรีย์หลายชนิด เช่น กรดอะมิโน น้ำตาล วิตามิน โคเอนไซม์ บางชนิดต้องการซีรัมเซลล์เม็ดเลือด เพปโทน และสารสกัดจากยีสต์ เป็นต้น

4. ลักษณะทางเมตาบอลิซึม (Metabolic Characteristics) กระบวนการดำรงชีวิตของเซลล์เกิดจากปฏิกิริยาทางเคมีที่เรียกว่า เมตาบอลิซึม ปฏิกิริยานี้จะแตกต่างตามชนิดของจุลินทรีย์

5. ลักษณะทางแอนติเจน (Antigenic Characteristics) องค์ประกอบของเซลล์เป็นแอนติเจนซึ่งเมื่อเข้าเซลล์สัตว์อื่นจะกระตุ้นให้สร้างแอนติบอดีที่เป็นซีรัมโปรตีนไปจับกับแอนติเจนนั้น แอนติบอดีมีความจำเพาะกับแอนติเจนที่กระตุ้น และแอนติเจนมีแตกต่างกันมากมาย ดังนั้นแอนติบอดีที่สร้างขึ้นจึงใช้ช่วยในการจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ได้

6. ลักษณะทางพันธุกรรม (Genetic Characteristics) สารพันธุกรรมเป็น DNA 2 สาย (Double-Strand) มีลักษณะคงที่ และช่วยในการจัดหมวดหมู่ชนิดของจุลินทรีย์โดยศึกษาจากองค์ประกอบของเบสของ DNA (DNA Base Composition) และลำดับ (Sequence) ของนิวคลีโอไทด์เบสใน DNA

7. ความสามารถในการทำให้เกิดโรค (Pathogenicity) ถึงแม้จะมีจุลินทรีย์จำนวนไม่มากที่ทำให้เกิดโรค แต่จุลินทรีย์บางชนิดทำให้เกิดโรคกับสัตว์ พืช หรือจุลินทรีย์อื่น ๆ

8. ลักษณะทางนิเวศวิทยา (Ecological Characteristics) ถิ่นที่อยู่ของจุลินทรีย์ มีความสำคัญในการบอกลักษณะของจุลินทรีย์นั้น ๆ

สแตปฟิโลคอคคัส ออเรียส (*Staphylococcus aureus* ; *S. aureus*)

สแตปฟิโลคอคคัส ออเรียส (*S. aureus*) เป็นแบคทีเรีย ที่มีลักษณะกลม เรียงตัวเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น หรือเป็นคู่ หรือเป็นสายสั้นๆ ไม่เคลื่อนที่ โคโลนีมีสีเหลืองหรือสีทอง เจริญเติบโตได้ดีในสภาพมีออกซิเจนมากกว่าในสภาพไม่มีออกซิเจน ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเติบโต คือ 35-40 องศาเซลเซียส ช่วง pH หรือความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการเติบโตอยู่ที่ 7-7.5

ที่มาของ สแตปฟิโลคอคคัส ออเรียส

เชื้อสแตปฟิโลคอคคัส ออเรียส จะมีชีวิตอยู่ได้ในอากาศ ฝุ่นละออง ขยะมูลฝอย น้ำ อาหารและนม หรืออาหารบรรจุเสร็จ สภาวะแวดล้อมภายนอกมนุษย์และสัตว์ ซึ่งมนุษย์และสัตว์นั้นเป็นแหล่งของเชื้อชนิดนี้โดยจะพบอยู่ตามทางเดินหายใจ ลำคอ หรือ เส้นผมและผิวหนังถึง 50% หรือมากกว่านี้ในคนที่มีสุขภาพดี และอาจพบเชื้อชนิดนี้ 60-80 % สิ่งที่ต้องคำนึงถึงอีกอย่างหนึ่งก็คือ การเก็บอาหารไว้ในอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมเป็นผลให้อาหารที่มีการปนเปื้อนอยู่แล้วมีการเพิ่มจำนวนของเชื้อและสร้างสารพิษได้อย่างรวดเร็ว

การเข้าสู่ร่างกาย

เชื้อสแตปฟิโลคอคคัส ออเรียส เข้าสู่ร่างกายได้จากการรับประทานอาหารที่มีเชื้อปนเปื้อน อาหารที่มักพบ เชื้อสแตปฟิโลคอคคัส ออเรียส ปนเปื้อนได้แก่ เนื้อและผลิตภัณฑ์เนื้อ เนื้อสัตว์ปีกและผลิตภัณฑ์จากไข่ อาหารประเภทสลัดเช่น ไข่ ทูน่า เนื้อไก่ มันฝรั่ง และมักกะโรนี ผลิตภัณฑ์ขนมอบ ครีมพาย เอแคลร์ ช็อกโกแลต แซนวิช และผลิตภัณฑ์นม ที่เก็บไว้ในอุณหภูมิที่ ไม่เหมาะสม และเก็บไว้เป็นเวลานานก่อนรับประทาน

อันตรายของ สแตปฟิโลคอคคัส ออเรียส

สแตปฟิโลคอคคัส ออเรียส บางสายพันธุ์สามารถสร้างสารพิษ คือ เอนเทอโรทอกซินซึ่งเป็นโปรตีนที่ทนต่อความร้อนได้ดี และเป็นสาเหตุทำให้เกิดอาการเจ็บป่วยในมนุษย์ สารพิษชนิดนี้ทนความร้อนถึงระดับ 143.3 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วินาทีได้ ดังนั้นอุณหภูมิในการหุงต้มธรรมดาหรืออุณหภูมิ

น้ำเดือดจึงไม่สามารถทำลายสารพิษชนิดนี้ได้ ลักษณะอาการที่บ่งบอกว่าติดเชื้อนั้นจะแสดงให้เห็นอย่างรวดเร็วและรุนแรงในหลายๆ กรณี ซึ่งอาการทั่วไปของผู้ได้รับเชื้อที่พบคือผู้ป่วยจะมีอาการคลื่นไส้อาเจียน วิงเวียน เป็นตะคริวในช่องท้องและอ่อนเพลียในผู้ป่วย บางรายอาจมีอาการอื่นแทรกซ้อน

เชื้อเอสเชอริเชียโคไล (*Escherichia coli* ; *E. coli*)

เชื้ออีโคไล (*E. coli*) เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อน (Gram Negative Rod) อยู่ในกลุ่มเอ็นเทอโรแบคทีเรียซี (Family Enterobacteriaceae) ปกติอาศัยอยู่ในลำไส้ของคนและสัตว์เลือดอุ่น พบเป็นจำนวนมากในอุจจาระ แต่ไม่พบในปัสสาวะ ด้วยเหตุนี้ทำให้ อีโคไลมีความสำคัญ ในการตรวจเชื้อเพื่อควบคุมคุณภาพของอาหารและผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ โดยใช้เป็นตัวบ่งชี้ (Indicator) ที่บ่งบอก ว่าผลิตภัณฑ์มีการปนเปื้อนของสิ่งปฏิกูลหรือไม่ในภาวะร่างกายปกติ เชื้ออีโคไลไม่ทำให้เกิดโรค แต่จะก่อให้เกิดโรคได้ในกรณีภูมิคุ้มกันบกพร่อง หรือในสภาวะที่ร่างกายอ่อนแอ เรียกว่า เชื้อฉวยโอกาส (Opportunistic Pathogen) ซึ่งเป็นตัวการสำคัญที่ก่อให้เกิดปัญหาการติดเชื้อในโรงพยาบาล (Secondary Infection)

ที่มาของ เชื้ออีโคไล

กลุ่มผู้ที่มีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อที่สำคัญคือ ผู้ที่ต้องทำงานเกี่ยวข้องกับเชื้อโรค ทำให้เกิดการติดเชื้อจากการทำงาน (Occupational Infection) ได้แก่ บุคลากรทางการแพทย์ที่สัมผัสกับผู้ป่วยที่ติดเชื้อและผู้ที่ทำงานในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ซึ่งต้องสัมผัสกับสารคัดหลั่งจากร่างกายผู้ที่ติดเชื้อ เป็นต้น เชื้ออีโคไลทำให้เกิดการตัดเชื้อโดยเกาะกับผนังเซลล์ของอวัยวะส่วนต่าง ๆ เช่น ไต กระเพาะปัสสาวะ และจะสร้างสารช่วยในการยึดเกาะให้เชื้ออยู่ในบริเวณนั้นได้ และจะสร้างสารต่างๆ ออกมาเพื่อทำลายเซลล์ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อขึ้น เชื้ออีโคไลทำให้เกิดกลุ่มอาการที่สำคัญ คือ การติดเชื้อที่ทางเดินปัสสาวะ เยื่อหุ้มสมองอักเสบในทารก และท้องร่วง การติดเชื้อที่ทางเดินปัสสาวะ (Urinary Tract Infection: UTI) เกิดจากเชื้ออีโคไลที่อาศัยอยู่ ในลำไส้ และอุจจาระ โดยเชื้อสามารถเคลื่อนที่ไปยังบริเวณทางเดินปัสสาวะขึ้นไปยังกระเพาะปัสสาวะ หรือไตได้ จากนั้นจะมีการแบ่งตัวของเชื้ออย่างรวดเร็วที่อวัยวะดังกล่าว ทำให้เกิดภาวะพบแบคทีเรียในปัสสาวะ (Bacteriuria) โดยสายพันธุ์ของเชื้ออีโคไลที่ทำให้เกิดการติดเชื้อที่ทางเดินปัสสาวะจะสร้างสารเอ็กซ์ แอดอีซินส์ (X adhesins) ช่วยในการยึดเกาะให้เชื้ออยู่บริเวณทางเดินปัสสาวะได้ และเชื้อจะสร้างสารฮีโมไลซิน (Hemolysin) เพื่อทำลายเซลล์ ทำให้เซลล์เม็ดเลือดและเซลล์ต่างๆ แตกโดย ผู้ที่ติดเชื้อที่ทางเดินปัสสาวะจะมีอาการปวดแสบบริเวณถ่ายปัสสาวะ มีอาการปวดท้อง เสียดท้องขณะปัสสาวะ ปัสสาวะบ่อย และรู้สึก เหมือนปัสสาวะไม่สุด การรักษาการ ติดเชื้อที่ทางเดินปัสสาวะโดยการให้ยาปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ เช่น กลุ่มฟลูออโรควิโนโลน (Fluoroquinolone) อย่างน้อย 7 วัน ร่วมกับการพยายามปรับสภาพปัสสาวะให้เป็นกรด

อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย (Bacterial Culture Media)

ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อแบบธรรมดา (Basic nutrient Media)

1. เพปโทน คือโปรตีนซึ่งถูกย่อยแล้วได้เป็นกรดอะมิโน และ Simple Nitrogenous Compounds โดยใช้กรด ด่าง หรือ เอนไซม์ คุณสมบัติของเพปโทน จะขึ้นอยู่กับความบริสุทธิ์ของคุณภาพโปรตีนที่ใช้และวิธีการย่อยโปรตีน (ด้วยกรด ด่างหรือ เอนไซม์) การย่อยด้วยกรดหรือด่าง จะทำลายวิตามินและกรดอะมิโน บางส่วนในโปรตีนไปซึ่งผิดกับการย่อยด้วยเอนไซม์ โปรตีนซึ่งใช้ในการผลิตเพปโทนมีหลายชนิด เช่น เคซีน (โปรตีนในน้ำนม) เจลลาติน เนื้อ ถั่วเหลือง และ Yeast Cells เป็นต้น เพปโทนเป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่แบคทีเรียต้องการมากสำหรับการเจริญเติบโต

2. Infusion และ Extracts เป็นสารสกัดจากเซลล์ต่าง ๆ ทั้งจากจุลชีพ (เช่น Yeast Extract ซึ่งความเป็นจริงถือว่าเป็นเพปโทนชนิดหนึ่ง) เนื้อเยื่อจากพืช (เช่น Malt Extract) และจากสัตว์ (เช่น Beef Extract Brain-Heart Infusion) เป็นซึ่งใช้แทนเพปโทนก่อนที่จะมีการคิดค้นการผลิตเพปโทนขึ้นมาใช้งานซึ่งในปัจจุบันก็ยังคงใช้อยู่ ในอาหารเลี้ยงเชื้อหลายชนิด Infusion และ extract นี้เป็นสารสกัดซึ่งมีส่วนประกอบไม่แน่นอนและไม่ชัดเจน โดยเป็นสารผสมระหว่างโปรตีน พอลิเพปไทด์ กรดอะมิโน คาร์โบไฮเดรต รวมถึงวิตามิน และ Growth Factors หลายชนิด

3. Solidifying Agents เป็นสารซึ่งใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้อาหารชนิดนั้นๆ แข็งตัว และกลายเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง สารพวกนี้ได้แก่ วุ้น เจลลาติน ซิลิกา เจล และ Polyacrylic Gels แต่ที่นิยมใช้มากที่สุดคือ วุ้น ซึ่งเป็นพอลิแซคคาร์ไรด์ ที่ได้จากการสกัดสาหร่ายสีแดง (Rhodophyceae) วุ้นที่ดีควรสะอาดปราศจากฝุ่นผงต่างๆ ละลายที่ 80 องศาเซลเซียส เมื่อเตรียมวุ้นความเข้มข้น 2% ในน้ำ (น้ำหนัก/ปริมาตร) แล้วทิ้งให้แข็งตัว สิ่งที่ได้ควรจะใสหรือหากขุ่นก็เพียงเล็กน้อย

4. อินดิเคเตอร์ (Indicators) ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อมักจะมีอินดิเคเตอร์ 2 ประเภท คือ

4.1 อินดิเคเตอร์ เพื่อบอกสภาวะความเป็นกรดด่าง (pH) ของอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่ง ได้แก่ Phenol Red, Bromothymol Blue, Bromocresol Purple, Neutral Red, Litmus, Andrade's Indicator เป็นต้น

4.2 อินดิเคเตอร์ เพื่อบอกสภาวะ Oxidation- Reduction Potential (E_h) ของอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น เมทิลลีนบูล (Methylene Blue) และ Resazurin เป็นต้น

5. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ใช้เติมลงไปเพื่อปรับปริมาณ Osmotic Pressure ของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เป็น Isotonic สำหรับเซลล์แบคทีเรีย หรือเพื่อปรับความเข้มข้นของเกลือของอาหารเลี้ยงเชื่อให้เป็นไปตามที่แบคทีเรียต้องการ

6. เดกโตรส (Dextrose) ใช้เพื่อเป็นแหล่งของคาร์บอน และพลังงานแก่แบคทีเรีย

7. น้ำ ใช้เพื่อทำให้ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ในรูปของสารละลายที่แบคทีเรียสามารถนำไปใช้ได้ ส่วนใหญ่จะใช้น้ำกลั่น (Distilled water)

8. Selective Agent เป็นสารเคมีซึ่งเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้แบคทีเรียบางชนิด เจริญได้เท่านั้น โดยแบคทีเรียชนิดอื่นๆ จะถูกยับยั้งไม่ให้เจริญ การใส่ Selective Agent ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อนี้ จะมีประโยชน์ในการแยกเชื้อซึ่งเป็นตัวก่อโรคออกจากเชื้อที่ไม่ก่อโรค Selective Agents ที่ใช้กันมีหลายชนิด ได้แก่สีย้อมบางชนิด เช่น Crystal Violet และ Brilliant Green (ใช้ยับยั้งการเจริญ ของแบคทีเรียพวกแกรมบวก) โซเดียมคลอไรด์ (ใช้ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่นๆ นอกเหนือจาก *Staphylococcus spp.* เนื่องจากไม่สามารถทนเกลือได้ในปริมาณสูงๆ เหมือน *Staphylococcus spp.*), Sodium Azide, Sodium Citrate, Sodium Tellurite, Sodium Lauryl Sulfate, Sodium Selenite, Iodine, Phenyl Ethanol และยาปฏิชีวนะต่างๆ เป็นต้น นอกจากนั้นการปรับความเป็นกรดหรือด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อให้ต่ำกว่าปกติ (เช่น pH 5.6 ใน Abouraud Dextrose Agar) หรือสูงกว่าปกติ (เช่น pH 8.8-9.0 ใน Alkaline Peptone Water สำหรับแยกเชื้อ *Vibrio cholerae*) ก็ สามารถใช้เป็น Selective Character ของอาหารเลี้ยงเชื้อได้

9. Reducing Agent เป็นสารเคมีซึ่งเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อช่วยส่งเสริมให้เกิดภาวะไร้ออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดีขึ้น สารเหล่านี้ได้แก่ Ascorbic Acid, Sodium Thioglycolate, Sodium Formaldehyde Sulfoxylate, Thiomalic Acid, Sodium Hydrosulfite และ Cysteine เป็นต้น

10. เลือด ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อพวก Enriched Media เลือดที่ใช้โดยมากมี 4 ชนิด คือ

- เลือดแกะ ซึ่งเอาไฟบรินออกแล้ว (Defibrinated Sheep Blood) เป็นเลือดที่ดีที่สุดเพราะให้ Hemolysis ได้ถูกต้องชัดเจน โดยเฉพาะ Hemolysis ที่เกิดจาก *Streptococci spp.*

- เลือดกระต่าย ซึ่งเอาไฟบรินออกแล้ว คุณภาพรองจากเลือดแกะ และให้ Hemolysis ได้ถูกต้องเช่นกัน

- เลือดม้า ซึ่งเอาไฟบรินออกแล้ว ให้ Hemolysis ไม่ถูกต้องโดยเฉพาะจาก *Streptococci* แต่มีประโยชน์ในการใช้ใส่ใน Mueller Hinton Media เพื่อการทดสอบความไวของ แบคทีเรียต่อยาต้านจุลชีพโดยใส่ในรูปของเลือดม้าที่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก

- เลือดคน ซึ่งหมดอายุแล้วจากคลังเลือด เป็นเลือดที่ใช้มากที่สุดเพราะหาง่าย ราคาถูก แต่อาจมีผลเสียจาก Citrate, Antimicrobial Agents และสารอื่นๆ ที่อยู่ในเลือด ซึ่งอาจทำให้แบคทีเรียบางชนิดไม่สามารถเจริญได้หรือให้ปฏิกิริยา Hemolysis ที่ผิดจากความเป็นจริง

เทคนิคการวัดโซนใส (Disc Diffusion Techniques)

เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากในห้องปฏิบัติการ เนื่องจากเป็นวิธีซึ่งสามารถปฏิบัติง่าย สะดวก และรวดเร็ว รวมทั้งสามารถให้ผลที่แน่นอนและถูกต้อง การทดสอบวิธีนี้ใช้หลักการแพร่โดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เติมลงบนกระดาษกรอง (Filter Paper Disc) ซึ่งวางบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่ใช้ในการตรวจสอบไว้ จะแพร่จากจุดเริ่มต้น ไปในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นเมื่อระยะทางที่สารแพร่

ออกไปเพิ่มขึ้น ความเข้มข้นของสารนั้นจะลดลงทำให้เกิดความแตกต่างของความเข้มข้นของสาร ณ จุดต่างๆกันรอบแผ่นกระดาษกรอง ในขณะเดียวกันจุลินทรีย์บนผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ถูกยับยั้งโดยสารออกฤทธิ์ ณ ความเข้มข้นของสารที่จุดใดๆ (ไกลกระดาษกรอง) ก็จะเจริญและเพิ่มจำนวนขึ้นจนเห็นได้ชัด แต่บริเวณใกล้กระดาษกรองซึ่งมีความเข้มข้นของสารมากพอที่จะยับยั้งเชื้อได้ จะไม่มีการเจริญของเชื้อให้เห็นจึงเกิดเป็นโซนใส (Inhibition Zone) ขึ้นอัตราการแพร่ของสารออกฤทธิ์ผ่านไปในอาหารเลี้ยงเชื้อมีอิทธิพลต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใส ซึ่งจะบอกถึงความสามารถของสารที่นำมาทดสอบว่าสามารถยับยั้งเชื้อได้มากน้อยเพียงใด ผลการยับยั้ง จุลินทรีย์วัดได้จากขนาดของโซนใสโดยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสจะแปรผกผันกับค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (Minimal Inhibitory Concentration หรือ MIC)

เนื่องจากเคมีชีวอนินทรีย์มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการย่อยและไฮโดรไลซ์ในร่างกายของมนุษย์ โดยมีเหล็ก สังกะสี และทองแดงเป็นองค์ประกอบในสารประกอบเมทัลโลเอนไซม์ มันจะทำงานได้ดีในสภาพความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสม โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารประกอบเชิงซ้อนโลหะคู่จะเป็นแบบจำลองเลียนแบบธรรมชาติที่ดี มีสารประกอบเชิงซ้อนโลหะคู่ที่จะกล่าวถึงต่อไปนี้ ทำหน้าที่เป็น active site

มีงานวิจัยเกี่ยวกับการสังเคราะห์เกี่ยวกับสารประกอบเชิงซ้อนโลหะแทรนซิชันกับลิแกนด์พอลิเดนเตท ดังนี้

Guddat, Twitchett และคณะ (1999) ได้สังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กกับ Uteroferrin โดยมีโลหะคู่เป็น Fe(III)/Fe(II) พบว่าสารประกอบเชิงซ้อนนี้มีสีชมพูและมีสมบัติเป็นเมทัลโลเอนไซม์

Twitchett และคณะ (2002) ได้สังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กโดยมี Fe(III)/Fe(II) เป็นโลหะคู่ ซึ่งจะทำหน้าที่เป็นตำแหน่งที่ว่องไวต่อปฏิกิริยา (Active site) ของโลหะเอนไซม์ชนิด Pig Purple Acid Phosphatase คณะผู้วิจัยได้นำ Mn(II), Ni(II), Cu(II) และ Zn(II) ไปแทนที่ Fe(II) จากนั้นได้นำสารประกอบเชิงซ้อนของโลหะแทรนซิชันทั้ง 5 ชนิดที่สังเคราะห์ได้ไปศึกษาการไฮโดรไลซ์กับฟอสเฟต

Horn และคณะ (2001) ได้สังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็ก $(Fe_4(\mu\text{-btppnol})_2(\mu\text{-O})_2(\mu\text{-OAc})_2](BPh_4)_2 \cdot CH_3CN(H_2O)_{½}(MeOH)_{½}$ เพื่อใช้เป็นแบบจำลองสำหรับโพลีนิวเคลียร์ของเหล็กเอ็นไซม์ พบว่าตำแหน่งการเข้าโคออร์ดิเนตของลิแกนด์กับโลหะมีความแตกต่างกัน สารประกอบเชิงซ้อนนี้มีสมบัติทางแม่เหล็กเป็นแบบแอนตีเฟอโรแมกเนติก

Neves และคณะ (1996) ได้สังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กคู่ 2 ชนิด ได้แก่ $[Fe^{III}Fe^{II}(BBPMP)(\mu\text{-OAc})_2]ClO_4 2H_2O$ และ $Fe_2^{III}Fe^{II}(BBPMP)(\mu\text{-OAc})(\mu\text{-OH})ClO_4$ พบว่า Fe(III)/Fe(II) ทำหน้าเป็นตำแหน่งที่ว่องไวต่อปฏิกิริยาของ Purple Acid Phosphatases โดยมีหมู่อะซิเตตเชื่อมโยง Fe(III)

และFe(II) เข้าด้วยกัน สารประกอบเชิงซ้อนทั้ง 2 ชนิดนี้ จะมีบริเวณที่สามารถให้เอ็นไซน์เข้าไปเชื่อมโยงและอยู่ในสถานะออกซิไดซ์และรีดิวซ์ได้ (เมื่อ BBPMP เป็นไอออนลบของ 2,6–bis[2-hydroxy-benzyl)(2-pyridylmethyl)amiomelthyl]-4-melthylphenol)

Trukhan และคณะ (2000) ได้สังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อน $[Fe_2O(L)_2(H_2O)](ClO_4)_2$ และ $Fe_2O(L)(BzO)]ClO_4$ ขึ้น (เมื่อ L= หมู่คาร์บอกซิลเลต) เมื่อมีหมู่คาร์บอกซิลเลตทำหน้าที่เป็นสะพานเชื่อมเหล็กทั้ง 2 อะตอม ก็ทำให้โมเลกุลนี้เสมือนหนึ่งเป็นแบบจำลองเลียนแบบธรรมชาติที่เป็นต้นแบบของ active site ของโปรตีนในร่างกายมนุษย์ และสามารถทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทั่ว ๆ ไปได้

Smith และคณะ (2008) ได้สังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนชนิดโลหะคู่แตกต่างกันแต่มีลิแกนด์ที่เหมือนกัน เช่น การสังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนโลหะคู่ Fe^{III}/Zn^{II} กับลิแกนด์ 2- bis{[(2-pyridylmethyl)-aminomethyl]-6-[2-hydroxy-benzyl)(2-pyridylmethyl)]aminomethyl}-4-methylphenol สารประกอบเชิงซ้อนที่สังเคราะห์ได้ก็เพื่อเป็น active site ของ uteroferrin และได้นำสารประกอบนี้มาหาความสามารถของการเป็น active site โดยเปรียบเทียบความสามารถกับสารประกอบเชิงซ้อนโลหะคู่ Ga^{III}/Zn^{II} ที่มีลิแกนด์เป็นชนิดเดียวกัน พบว่าสารประกอบเชิงซ้อนโลหะคู่ Ga^{III}/Zn^{II} มีความว่องไวในการเร่งปฏิกิริยามากกว่า

Rebecca และคณะ (2008) ได้สังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนที่มีสังกะสี-สังกะสีเป็นโลหะคู่ 2 ชนิด ได้แก่ $[Zn_2(HL_1)(CH_3COO)](PF_6)\cdot H_2O$ และ $Li[Zn_2(HL_1)]_4(PO_4)_2(PF_6)_3\cdot(CH_3OH)$ เพื่อเป็นแบบจำลองในการศึกษาความเป็น active site กับเอนไซม์ฟอสโฟเอสเทอเรส (phosphoesterases) ผู้วิจัยได้ใช้ bis(4-nitrophenyl)phosphate (bNPP) เป็นซับสเตรต พบว่าสารประกอบเชิงซ้อนที่มีโลหะคู่ของสังกะสี-สังกะสีนี้ทำหน้าที่เป็น active site ที่ดี และให้ค่า $k_{cat} = 1.26 \pm 0.06 \times 10^{-6}\ s^{-1}$. (เมื่อ$H_3L_1$= [2-((2-hydroxy-3-(((2-hydroxyethyl)(pyridin-2-ylmethyl)amino)methyl)-5-methylbenzyl)(pyridin-2-ylmethyl)amino)acetic acid])

Smith และคณะ (2008) ได้สังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนโลหะคู่ของทองแดง คือ $[Cu_2(BPMP)(OAc)_2]\cdot(ClO_4)xH_2O$ พบว่า สารประกอบเชิงซ้อนที่มีโลหะคู่ของทองแดงนี้ทำหน้าที่เป็น active site เช่นกัน ซึ่งให้ค่า k_{cat} = 15 +/- 1.5 min(-1), K(M) = 6.4 +/- 1.8 mM (เมื่อ H-BPMP = 2,6-bis[bis(pyridin-2-ylmethylamino)methyl]-4-methylphenol)

Xavier และคณะ (2009) ได้สังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนโลหะคู่ 2 ชนิดคือ Fe^{III}/Co^{II} และ Ga^{III}/Co^{II} สารประกอบเชิงซ้อนนี้คือ $[Fe^{III}Co^{II}(BPBPMP)(\mu\text{-}OAc)_2]\cdot(ClO_4)$ และ $[Ga^{III}Co^{II}(BPBPMP)(\mu\text{-}OAc)_2]\cdot(ClO_4)$ จากนั้นได้นำสารประกอบเชิงซ้อนทั้ง 2 ชนิดนี้มาเป็นแบบจำลองเลียนแบบธรรมชาติ เพื่อศึกษาการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซ์กับซับสเตรตชนิด bis(2,4-dinitrophenyl)phosphate พบว่าที่ตำแหน่งที่มีโลหะคู่ได้ทำหน้าที่เป็น active site (เมื่อ H_2BPBPMP คือ (2-bis[{(2-pyridyl-methyl)-aminomethyl}-6-{(2-hydroxy-benzyl)-(2-pyridyl-methyl)}-aminomethyl]-4-methylphenol)

Anob และคณะ(2011) ได้สังเคราะห์สารประกอบเตตระเมอร์ของเหล็ก $[Fe_4(HPBA)_2(\mu\text{-}CH_3COO)_2(\mu\text{-}O)(\mu\text{-}OH)(OH_2)_2]ClO_4 \cdot 5H_2O$ เพื่อเป็นคะตะลิสต์เป็นแบบจำลองเลียนแบบธรรมชาติเพื่อศึกษาการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลต์กับ 2,4-bis(dinitrophenylphosphate) ซึ่งเป็นซับสเตรต โดยมีโลหะคู่ คือ เหล็ก ทำหน้าที่เมทัลโลเอนไซมีพบว่ามีค่า $k_{cal} = 1.6\ (\pm 0.2) \times 10^{-3}\ s^{-1}$ มีค่า pk_a 3 ค่า คือ 5.3 , 6.2 และ 8.4 และค่า $K_m = 7.4 \pm 0.6$ mM

จากงานที่กล่าวมาทั้งหมด จะเห็นได้ว่าสารประกอบเชิงซ้อนโลหะคู่ที่สังเคราะห์ขึ้นดังกล่าว จะมีโลหะคู่เป็นบริเวณ active site ซึ่งทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาเมทัลโลเอนไซม์ของโปรตีนได้ ดังนั้นในโครงการวิจัยนี้จะสังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนโลหะคู่ที่มีลิแกนด์แบบมัลติเดนเตต ซึ่งเป็นโลหะเอนไซม์ชนิดหนึ่งที่ทำหน้าที่เป็นเมทัลโลเอนไซม์ของโปรตีนได้ โดยสารประกอบเชิงซ้อนโลหะคู่ที่จะสังเคราะห์มี 2 ชนิด คือ Fe^{III}/Fe^{II} และ Fe^{III}/Zn^{II} และที่สำคัญคือสารประกอบเชิงซ้อนที่จะสังเคราะห์ขึ้นในงานวิจัยนี้ จะสามารถนำไปเป็นแบบจำลองเลียนแบบธรรมชาติของเมทัลโลเอนไซม์ในห้องทดลอง และใช้ในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่เกี่ยวกับการไฮโดรไลซ์โปรตีน ตลอดจนจะสามารถนำสารประกอบเชิงซ้อนโลหะเอนไซม์ที่ได้ไปศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์ ต่อไปได้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

การสังเคราะห์ คุณลักษณะและการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารประกอบเชิงซ้อนของเหล็ก(III)-เหล็ก(II) และสังกะสี(III)-สังกะสี(II) กับลิแกนด์พอลิเดนเตท มีวัสดุ อุปกรณ์ สารเคมี เครื่องมือที่ใช้ และวิธีการศึกษา ดังนี้

วัสดุ และอุปกรณ์

1. บีกเกอร์ ขนาด 50 มิลลิลิตร
2. หลอดหยด
3. แท่งแก้วคนสาร
4. กระจกนาฬิกา
5. จุกยาง
6. ปิเปต ขนาด 10 มิลลิลิตร
7. ช้อนตักสาร
8. พาราฟิล์ม
9. กระดาษพีเอช
10. เตาอบ
11. เตาให้ความร้อน
12. ขวดไวอัล
13. หลอดทดลอง
14. น้ำกลั่น
15. แท่งแม่เหล็กคนสาร
16. กระดาษกรอง
17. ชุดรีฟลักซ์สาร
18. ขวดก้นกลม ขนาด 50 มิลลิลิตร
19. ปิเปตขนาด 1 และ 5 มิลลิลิตร
20. อะลูมิเนียมฟอยล์
21. เครื่องชั่งสารเคมี ความละเอียด 4 ตำแหน่ง

สารเคมี

1. 2,6-bis(hydroxymethyl)-4-methyl phenol; $CH_3C_6H_2(CH_2OH)_2OH$ มวลโมเลกุลเท่ากับ 168.19 กรัมต่อโมล เกรด ACS reagent ความบริสุทธิ์ 95.0 % บริษัท Sigma - Aldrich

2. Chloroform ; $CHCl_3$ มวลโมเลกุลเท่ากับ 119.38 กรัมต่อโมล เกรด ACS reagent ความบริสุทธิ์ $\geq$ 99.9% บริษัท Sigma - Aldrich

3. 1-(3-aminopropyl)imidazole ; $C_6H_{11}N_3$ มวลโมเลกุลเท่ากับ 125.17 กรัมต่อโมล ความบริสุทธิ์ $\geq$ 97.0 % บริษัท Sigma – Aldrich

4. 2-Pyridine carboxaldehyde ; C_6H_5NO มวลโมเลกุลเท่ากับ 107.11 กรัมต่อโมล ความบริสุทธิ์ $\geq$ 99.0% บริษัท Sigma - Aldrich

5. Sodium perchlorate ; $NaClO_4$ มวลโมเลกุลเท่ากับ 122.44 กรัมต่อโมล ความบริสุทธิ์ $\geq$99.8 % บริษัท Sigma - Aldrich

6. เอทานอล (Ethanol ; C_2H_5OH) มวลโมเลกุลเท่ากับ 46.07 กรัมต่อโมล เกรด ACS reagent ความบริสุทธิ์ $\geq$99.5 % บริษัท Sigma - Aldrich

7. กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid ; HCl) มวลโมเลกุลเท่ากับ 36.46 กรัมต่อโมล เกรด ACS reagent บริษัท Sigma - Aldrich

8. Potassium hydroxide ; KOH มวลโมเลกุลเท่ากับ 56.11 กรัมต่อโมล เกรด ACS reagent บริษัท Sigma - Aldrich

9. Salicyladehyde ; 2-$(HO)C_6H_4CHO$ มวลโมเลกุลเท่ากับ 122.12 กรัมต่อโมล ความบริสุทธิ์ $\geq$ 98.0 % บริษัท Sigma - Aldrich

10. Dichloromethane ; CH_2Cl_2 มวลโมเลกุลเท่ากับ 84.93 กรัมต่อโมล เกรด ACS reagent ความบริสุทธิ์ $\geq$99.7 % บริษัท Sigma - Aldrich

11. Sodium hydrogen carbonate ; $NaHCO_3$ มวลโมเลกุลเท่ากับ 84.01 กรัมต่อโมล เกรด ACS reagent ความบริสุทธิ์ $\geq$99.5 % บริษัท Sigma - Aldrich

12. Anhydrous sodium sulfate ; Na_2SO_4 มวลโมเลกุลเท่ากับ 142.04 กรัมต่อโมล เกรด ACS reagent ความบริสุทธิ์ $\geq$99.0 % บริษัท Sigma - Aldrich

13. Sodium borohydride ; $NaBH_4$ มวลโมเลกุลเท่ากับ 37.83 กรัมต่อโมล ความบริสุทธิ์ $\geq$99.0 % บริษัท Sigma - Aldrich

14. Sodium acetate trihydrate ; $CH_3COONa{\cdot}3H_2O$ มวลโมเลกุลเท่ากับ 136.18 กรัมต่อโมล เกรด ACS reagent ความบริสุทธิ์ $\geq$99.0 % บริษัท Sigma - Aldrich

15. Triethylamine ; $(C_2H_5)_3N$ มวลโมเลกุลเท่ากับ 101.19 กรัมต่อโมล เกรด ACS reagent ความบริสุทธิ์ $\geq$99.8 % บริษัท Sigma - Aldrich

16. เมทานอล (Methanol ; CH_3OH) มวลโมเลกุลเท่ากับ 32.04 กรัมต่อโมล เกรด ACS reagent ความบริสุทธิ์ $\geq$99.8 % บริษัท Sigma - Aldrich

17. 2-aminomethylpyridine ; $C_6H_8N_2$ มวลโมเลกุลเท่ากับ 108.14 กรัมต่อโมล ความบริสุทธิ์ 99.0 % บริษัท Sigma - Aldrich

18. Ferrous chloride tetrahydrate ; $FeCl_2{\cdot}4H_2O$ มวลโมเลกุลเท่ากับ 198.81 กรัมต่อโมล ความบริสุทธิ์ 99.0 % บริษัท Sigma - Aldrich

19. Ferric chloride hexahydrate ; $FeCl_3{\cdot}6H_2O$ มวลโมเลกุลเท่ากับ 270.30 กรัมต่อโมล ความบริสุทธิ์ 97.0 % บริษัท Sigma - Aldrich

20. Zinc acetate dehydrate ; $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ มวลโมเลกุลเท่ากับ 219.51 กรัมต่อโมล ความบริสุทธิ์ 99.99 % บริษัท Sigma – Aldrich

เครื่องมือที่ใช้

1. ฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรมิเตอร์ (FT-IR) ยี่ห้อ Perkin Elmer เตรียมโดยวิธีอัดสารตัวอย่างเป็นแผ่น (Disc) โดยผสมสารตัวอย่างกับโพแทสเซียมโบรไมด์ (KBr) แล้วนำไปวิเคราะห์ในช่วงเลขคลื่น 4000 – 400 cm^{-1}

2. เครื่องวิเคราะห์หามวลโมเลกุล ด้วยเครื่อง Liguid Chromatograph – Mass Spectrometer โดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายและทำให้เกิดการแตกตัวเป็นไอออนด้วยวิธี Electro spray ionisation (ESI)

3. อัลตราไวโอเลต - วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (UV-Vis) ยี่ห้อ Shimadzu UV - 1601 เตรียมสารตัวอย่างละลายในตัวทำละลายเมทานอล จากนั้นนำไปวิเคราะห์ในช่วงแสงที่ตามองเห็น (Visible) ช่วงความยาวคลื่นตั้งแต่ 200 - 800 นาโนเมตร

วิธีการทดลอง

ตอนที่ 1 การสังเคราะห์สารประกอบ 2-[(3-pyrazol-l-yl-propylamino)-methyl]-phenol (1)

1-(3-aminopropyl)imidazole 3.57 กรัม ละลายใน 1 M KOH จากนั้นเติมลายละลายดังกล่าวลงใน Salicyladehyde 3.19 มิลลิลิตร ที่ละลายอยู่ในสารละลายเอทานอล 50 มิลลิลิตร คนสารละลาย 15 นาที จะได้สารละลายที่เหลืองขุ่น จากนั้นเติมสารละลายเมทานอลลงไป 30 มิลลิลิตร คนสารละลายต่อเป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้มาเติม Sodium borohydride จำนวน 2.00 กรัม ทำการเติมที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส คนสารละลายเป็นเวลา 20 นาที ทำการปรับ pH ของสารละลายให้มี pH เท่ากับ 4 ด้วย Glacial acetic acid นำสารละลายมาระเหยตัวทำละลายด้วยวิธีการระเหยตัวทำละลายแบบลดความดันได้ตะกอนสีขาวเกิดขึ้น นำตะกอนสีขาวมาผสมน้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร ทำการสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนจำนวน 4 ครั้ง ๆ ละ 50 มิลลิลิตร นำสารละลายชั้นอินทรีย์มาสกัดด้วย Sodium hydrogen carbonate อิ่มตัว จำนวน 4 ครั้ง ๆ ละ 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายชั้นอินทรีย์มาเติม Anhydrous sodium sulfate กรองสารละลายที่ได้และนำสารละลายมาระเหยตัวทำละลายด้วยวิธีการระเหยตัวทำละลายแบบลดความดัน จะได้สารประกอบ 2-[(3-pyrazol-l-yl-propylamino)-methyl]-phenol

ตอนที่ 2 การสังเคราะห์สารประกอบ 2,6-bis(chloromethyl)-4-methyl phenol (2)

2,6-bis(hydroxymethyl)-4-methyl phenol 5.00 กรัม ละลายในลายละลายกรดไฮโดรคลอริก 36% คลอโรฟอร์ม 100 มิลลิลิตร คนสารละลายที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6-8 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายที่

ได้มาทำการสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน จำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 50 มิลลิลิตร เติม anh. Na_2SO_4 จากนั้นระเหยตัวทำละลายออกด้วยวิธีการระเหยตัวทำละลายแบบลดความดัน จะได้สารประกอบ 2,6-bis(chloromethyl)-4-methyl phenol

ตอนที่ 3 การสังเคราะห์สารประกอบ 2,2'-Dipicolamine (3)

2-(Aminomethyl)pyridine 2.7 กรัม ละลายใน 1 M KOH จากนั้นเติมลายละลายดังกล่าวลงใน 2-Pyridine carboxaldehyde 2.7 กรัม ที่ละลายอยู่ในสารละลายเอทานอล 50 มิลลิลิตร คนสารละลาย 30 นาที จะได้สารละลายที่เหลืองขุ่น จากนั้นเติมสารละลายเมทานอลลงไป 30 มิลลิลิตร คนสารละลายต่อเป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้มาเติม Sodium borohydride จำนวน 2.00 กรัม ทำการเติมที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส คนสารละลายเป็นเวลา 20 นาที ทำการปรับ pH ของสารละลายให้มี pH เท่ากับ 4 ด้วย Glacial acetic acid นำสารละลายมาระเหยตัวทำละลายด้วยวิธีการระเหยตัวทำละลายแบบลดความดันได้ตะกอนสีขาวเกิดขึ้น นำตะกอนสีขาวมาผสมน้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร ทำการสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนจำนวน 4 ครั้ง ๆ ละ 50 มิลลิลิตร นำสารละลายชั้นอินทรีย์มาสกัดด้วย Sodium hydrogen carbonate อิ่มตัว จำนวน 4 ครั้ง ๆ ละ 30 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายชั้นอินทรีย์มาเติม Anhydrous sodium sulfate กรองสารละลายที่ได้และนำสารละลายมาระเหยตัวทำละลายด้วยวิธีการระเหยตัวทำละลายแบบลดความดัน ได้สารประกอบ 2,2'-Dipicolamine

ตอนที่ 4 การสังเคราะห์สารประกอบ 2-[(Bis-pyridin-2-ylmethyl-amino)-methyl]-6-{[(2-hydroxy-benzyl)-(4-imidazol-1-yl-butyl)-amino]-methyl}-4-methyl-phenol [H_2L]

นำ 2,6-bis(chloromethyl)-4-methyl phenol , 2-[(3-pyrazol-1-yl-propylamino)-methyl]-phenol และ 2,2'-Dipicolamine (ที่ได้จากการทดลองตอนที่ 1-3) ละลายในตัวทำละลายอะซิโตนไนไตรท์ จำนวน 40 มิลลิลิตร เติม Na_2CO_3 จำนวน 75 มิลลิกรัม คนสารละลายที่ได้เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำสารละลายมาระเหยตัวทำละลาย นำสารที่ได้มาเติม Sodium hydrogen carbonate อิ่มตัว ทำการสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนจำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 25 มิลลิลิตร นำสารละลายชั้นอินทรีย์มาเติม Anhydrous sodium sulfate กรองสารละลายที่ได้และนำสารละลายมาระเหยตัวทำละลายด้วยวิธีการระเหยตัวทำละลายแบบลดความดัน จะได้สารประกอบ ได้สารประกอบ 2-[(Bis-pyridin-2-ylmethyl-amino)-methyl]-6-{[(2-hydroxy-benzyl)-(4-imidazol-1-yl-butyl)-amino]-methyl}-4-methyl-phenol

ตอนที่ 5 การสังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อน M_1M_2L เมื่อ M_1 คือ Fe(II) , Fe(III) และ M_2 คือ Fe(III) , Zn(II)

สารประกอบเชิงซ้อน 1 เตรียมดังนี้ นำลิแกนด์ H_2L 0.08 กรัม ละลายในตัวทำละลายเมทานอล จำนวน 20 มิลลิลิตร เติม $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0.05 กรัม และ $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ จำนวน 0.04 กรัม จะได้สารละลายสีม่วงดำ จากนั้นเติม $CH_3COONa \cdot H_2O$ 0.11 กรัม คนสารละลายที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที เติม $NaClO_4$ 0.08 กรัม คนเป็นเวลา 30 นาที เติม KOH เข้มข้น 1 โมลาร์ คนสารละลายต่ออีก 5 นาที คนสารละลายที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส กรองสารละลายตั้งที่ไว้ที่อุณหภูมิห้องจะปรากฏผงสีม่วงของ $[Fe^{III}Fe^{II}(L)(\mu\text{-}O)(H_2O)_2](ClO_4) \cdot H_2O$ **(1)** ส่วนสารประกอบเชิงซ้อน 2 เตรียมได้จากการเปลี่ยน $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ เป็น $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ จะปรากฏผงสีม่วงน้ำตาลของ $[Fe^{III}Zn^{II}(L)(\mu\text{-}O)(H_2O)](ClO_4)$ **(2)**

ตอนที่ 2 วิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพของสารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กและสังกะสีกับลิแกนด์มัลติเดนเตต มีเครื่องมือ ดังนี้

นำสารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กและสังกะสีกับลิแกนด์มัลติเดนเตตในแต่ละการทดลอง มาศึกษาสมบัติทางกายภาพด้วยเครื่องมือต่าง ๆ ดังนี้

1. ฟูเรียทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรมิเตอร์ ศึกษาลักษณะการสั่นพันธะในสารตัวอย่าง และบอกหมู่ฟังก์ชันที่ได้จากการเลขคลื่น (Wavenumber ; cm^{-1})

2. เครื่องวิเคราะห์หามวลโมเลกุล ด้วยเครื่อง Liguid Chromatograph – Mass Spectromeeter โดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายและทำให้เกิดการแตกตัวเป็นไอออนด้วยวิธี Electro spray ionisation (ESI)

3. อัลตราไวโอเลต - วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (UV - Vis) ช่วงความยาวคลื่น 200 - 800 นาโนเมตร

ตอนที่ 3 ศึกษาประสิทธิภาพของลิแกนด์และสารประกอบเชิงซ้อนที่สังเคราะห์ได้ ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

1. การเตรียมแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

ใช้แบคทีเรียที่มีอายุไม่เกิน 24 ชั่วโมง และความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ต้องในปริมาณที่เหมาะสม โดยทั่วไปนิยมใช้เชื้อแบคทีเรียปริมาณ 10^5-10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร วิธีการเตรียมมีดังนี้

1.1 เขี่ยเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* ที่ใช้ลงในอาหารเหลว Nutrient agar ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปเพาะบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.2 นำเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* ที่บ่มไว้มาปรับความขุ่นของการเจริญเติบโตให้มีค่าความขุ่นเท่ากับสารละลายมาตรฐาน McFaland (McFaland standard) เบอร์ 0.5

วิธีการเตรียมสารละลายมาตรฐาน McFaland มีดังนี้

- นำสารละลาย A (ละลายแบเรียมคลอไรด์ ไดไฮเดรต 1.175 กรัม ในน้ำ 10 มิลลิลิตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตสารละลาย A ที่เจือจางลง 10 เท่านี้ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย B (ละลาย H_2SO_4 เข้มข้น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในน้ำ 99 มิลลิลิตร) ปริมาตร 99.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดีนำไปใส่ในหลอดฝาเกลียว ปริมาตรหลอดละ 10 มิลลิลิตร ปิดให้แน่น เก็บในที่มืดมีอายุการใช้งาน 6 เดือน ชนิดของหลอดแก้วที่ใส่สารละลายนี้ควรเป็นชนิดเดียวกับหลอดเชื้อแบคทีเรีย เพื่อจะได้เปรียบเทียบความขุ่นกันได้ และก่อนใช้ต้องเขย่าสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกันก่อน (บุษกร อุตรภิชาต. 2549 : 258)

2. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

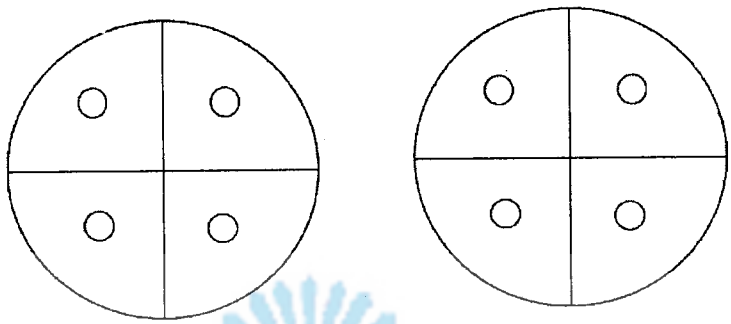
ในการทดสอบนี้จะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแบบแข็ง โดยวิธี Agar diffusion โดยใช้อาหาร Nutrient agar (NA) หรือ beef peptone agar โดยเทอาหารที่เตรียมได้ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ใส่ในจานอาหารซึ่งมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางส่วนก้นจาน และฝาจาน เท่ากับ 9 และ 10 เซนติเมตร ตามลำดับ จากนั้นวางทิ้งไว้ให้อาหารในจานเพาะเชื้อแข็ง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วิธีการนี้จะได้อาหารแข็งที่มีความหนา 4 เซนติเมตร (บุษกร อุตรภิชาต. 2549 : 121)

3. การเตรียมสารประกอบเชิงซ้อน

นำสารประกอบเชิงซ้อนรวมทั้งสารตั้งต้นที่ใช้ในการทดลอง นำมาเจือจางที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 20, 40 และ 80 มิลลิกรัมต่อปริมาตรตัวทำละลาย 10 มิลลิลิตร ใช้ตัวทำละลาย คือ เมทานอล (MeOH) เป็นตัวทำละลาย ในแต่ละความเข้มข้นทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard derivation; SD)

4. วิธีศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *E. coli* และ *S. aureus* ของสารประกอบเชิงซ้อนสารประกอบเชิงซ้อนที่สังเคราะห์ได้

4.1 เขียนที่จานอาหารแข็ง เพื่อระบุตำแหน่งที่จะวางแผ่นกระดาษตาปลาขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตรทั้งหมด 4 ตำแหน่ง ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 ตำแหน่งที่จะวางแผ่นกระดาษตาปลาขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร

4.2 วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียลงบนอาหารทดสอบ ใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อแบคทีเรียที่ปรับความขุ่นไว้โดยมีปริมาณเชื้อประมาณ 105 – 107 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แล้วบิดให้แห้งพอหมาด ๆ กับข้างหลอดทดลอง จากนั้นทำการกวาดให้ทั่วบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยลากผ่านเส้นศูนย์กลางจานเพาะเชื้อแล้วป้ายเป็นเส้นตั้งฉากผ่านเส้นที่ลากไว้ถี่ ๆ ให้ทั่วผิวหน้าแล้วหมุนจานเพาะเชื้อไปประมาณ 60 องศา แล้วป้ายเช่นกัน ทำเช่นนี้ 3 ครั้ง เพื่อให้แบคทีเรียกระจายสม่ำเสมอทั่วผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ ทิ้งไว้ประมาณ 3 - 5 นาทีเพื่อให้ส่วนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง

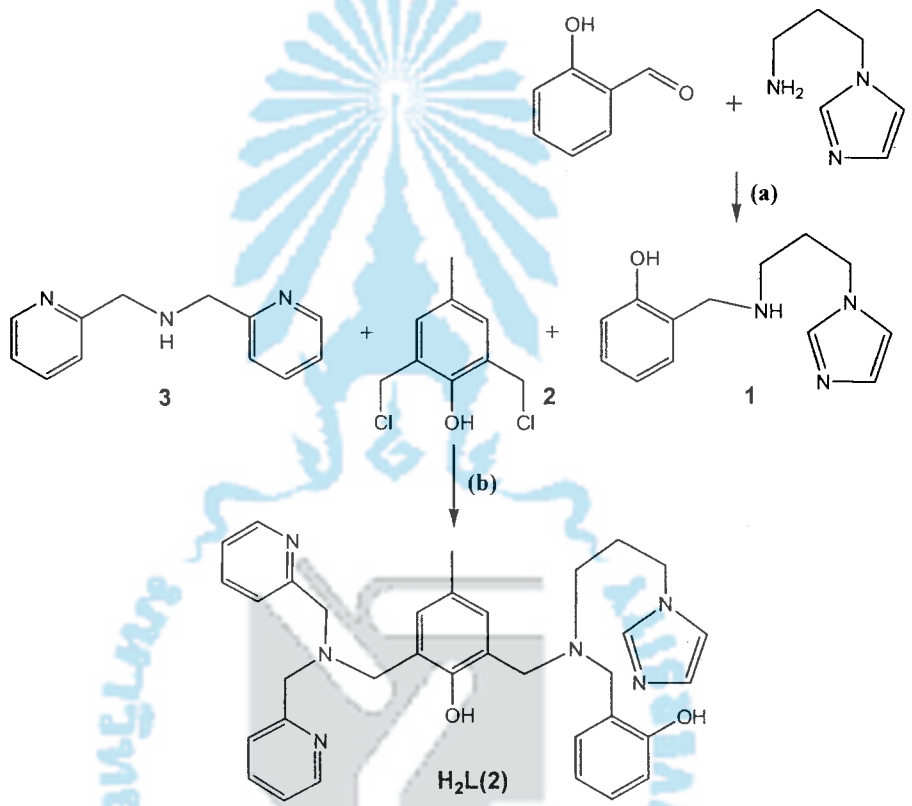
4.3 การทดสอบสารตั้งต้น และสารประกอบเชิงซ้อนที่สังเคราะห์ได้ โดยใช้กระดาษตาปลาปราศจากเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ใช้ปากคีบ (Forceps) คีบกระดาษวางบนจานเพาะเชื้อที่เตรียมไว้ข้างต้นแล้วกดเบา ๆ มาวางที่ตำแหน่งที่กำหนดไว้

4.4 หยดตัวอย่างสารตั้งต้น และสารประกอบเชิงซ้อนที่สังเคราะห์ได้วางใส่ในแผ่นกระดาษตาปลา คนละตำแหน่งตามลำดับ ตำแหน่งละ 20 ไมโครลิตร รวมทั้งหยดตัวทำละลายน้ำเป็นตัวควบคุม (Control) โดยการใช้ไมโครปิเปตอัตโนมัติ (Automatic Pipette) ที่ปราศจากเชื้อ เสร็จแล้วนำจานเพาะเชื้อนี้นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วนำมาวัดเส้นผ่านศูนย์กลาง ของบริเวณที่ไม่มีแบคทีเรียขึ้น (Inhibition Zone) โดยวัดหน่วยเป็นมิลลิเมตร

4.5 การอ่านผล เมื่อบ่มเชื้อจนครบ 24 ชั่วโมงแล้ว ให้วัดขนาดของโซนใสที่เกิดขึ้น โดยวัดจากขอบโซนข้างหนึ่งไปยังขอบโซนอีกข้างหนึ่ง โดยให้ผ่านจุดศูนย์กลางของกระดาษตาปลาด้วย บันทึกหน่วยเป็นมิลลิเมตร (ขอบโซนที่วัดต้องเป็นโซนใสที่ชัด ถ้ามีเชื้อขึ้นบางๆ ให้ถือว่าบริเวณนั้นยังมีปริมาณสารตั้งต้น หรือสารประกอบเชิงซ้อนที่สังเคราะห์สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้) (อมรรัตน์ สีสุกอง และคณะ. 2550 : 33)

บทที่ 4
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

โครงการวิจัยในครั้งนี้ ก่อนการสังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนต้องเริ่มต้นจากการสังเคราะห์ลิแกนด์ H_2L ก่อนวิธีสังเคราะห์สรุปพอสังเขป ดังแผนภาพที่ 2



แผนภาพที่ 2 การสังเคราะห์ลิแกนด์ H_2L ใช้สารเคมี คือ 2-[(3-pyrazol-l-yl-propylamino)-methyl]-phenol(1)2,6-bis(chloromethyl)-4-methyl phenol (2) และ 2,2'-Dipicolamine (3)

สารตั้งต้น Salicyladehydeทำปฏิกิริยากับ 1-(3-aminopropyl)imidazole ได้สารประกอบ 2-[(3-pyrazol-l-yl-propylamino)-methyl]-phenol (1) จากนั้นเตรียม 2,6-bis(chloromethyl)-4-methyl phenol (2) จากการทำปฏิกิริยาระหว่าง 2,6-bis(hydroxymethyl)-4-methyl phenol และกรดเกลือเข้มข้น และเตรียม 2,2'-Dipicolamine (3) จากการทำปฏิกิริยาระหว่าง 2-(Aminomethyl)pyridine และ 2-Pyridine carboxaldehyde จากนั้นนำสารประกอบที่เตรียมได้ทั้งสามชนิดมาทำปฏิกิริยากันจะได้สารประกอบ **2**-[(Bis-pyridin-2-ylmethyl-amino)-methyl]-6-{[(2-hydroxy-benzyl)-(4-imidazol-1-yl-butyl)-amino]-methyl}-4-methyl-phenol (H_2L) ซึ่งเป็นลิแกนด์ที่ต้องการแล้วทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ตารางที่ 1 สมบัติทางกายภาพของสารประกอบเชิงซ้อน

สารประกอบ	มวลโมเลกุล	ลักษณะทางกายภาพ	จุดหลอมเหลว ($^{\circ}C$)	ร้อยละผลผลิตที่ได้ (%yield)
2-[(3-pyrazol-l-yl-propylamino)-methyl]-phenol	231.2	ผงสีเหลือง	-	67
2,6-bis(chloromethyl)-4-methylphenol	205.5	ผงสีเหลือง	-	45
2,2'-Dipicolamine	199	ผงสีเหลือง	-	40
H_2L	564.2	ผงสีเหลือง	-	30
สารประกอบเชิงซ้อน 1	847.3	ผงสีน้ำตาล	230	29
สารประกอบเชิงซ้อน 2	798.2	ผงสีน้ำตาลเข้ม	243	32

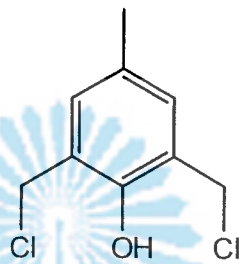
ตารางที่ 2 สมบัติการละลายของสารประกอบเชิงซ้อน

สารประกอบ	เมทานอล	เอทานอล	ไดคลอโรมีเทน	ไดเมทิลซัลฟอกไซด์
2-[(3-pyrazol-l-yl-propylamino)-methyl]-phenol	✓	✓	✗	✓
2,6-bis(chloromethyl)-4-methylphenol	✓	✓	✗	✓
2,2'-Dipicolamine	✓	✓	✗	✓
H_2L	✓	✓	✗	✓
สารประกอบเชิงซ้อน 1	✓	✓	✗	✓
สารประกอบเชิงซ้อน 2	✓	✓	✗	✓

หมายเหตุ ✓ หมายถึง ละลายได้ดี ✗ หมายถึง ไม่ละลาย

การศึกษาสมบัติทางสเปกโทรสโกปีด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี

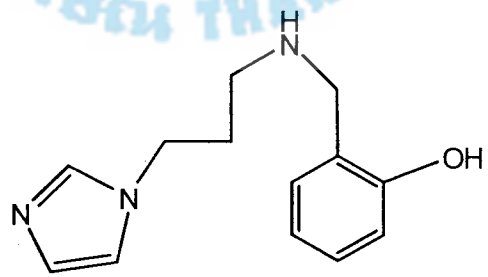
โครงสร้างของสารประกอบ 2,6-bis(chloromethyl)-4-methyl phenol



ตารางที่ 3 ข้อมูลอินฟราเรดของสารประกอบ 2,6-bis(chloromethyl)-4-methyl phenol

เลขคลื่น (cm^{-1})	หมู่ฟังก์ชัน
2980	ν(CH-sp^2)
2926	ν(CH-sp^3)
1610	ν(C=C)
1454	δ(OH) in-of-plane
1329	$\delta(CH_3)$
1209	$\delta(CH_2)$
974	δ(=CH)
769	δ(OH) out-of-plane

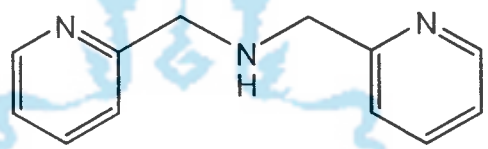
โครงสร้างของสารประกอบ 2-[(3-pyrazol-1-yl-propylamino)-methyl]-phenol



ตารางที่ 4 ข้อมูลอินฟราเรดของสารประกอบ 2-[(3-pyrazol-l-yl-propylamino)-methyl]-phenol

เลขคลื่น (cm^{-1})	หมู่ฟังก์ชัน
3120	N-H of secondary amine
3403	O-H of hydroxyl
2949	sp^2 of C-H
1459	sp^3 of C-H
1595	C-N
1459	*Ortho*- substituted ring one strong band

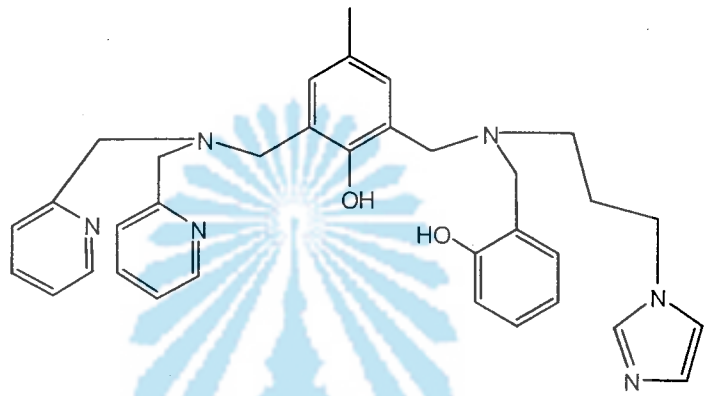
โครงสร้างของสารประกอบ 2,2'-Dipicolamine



ตารางที่ 5 ข้อมูลอินฟราเรดของสารประกอบ 2,2'-Dipicolamine

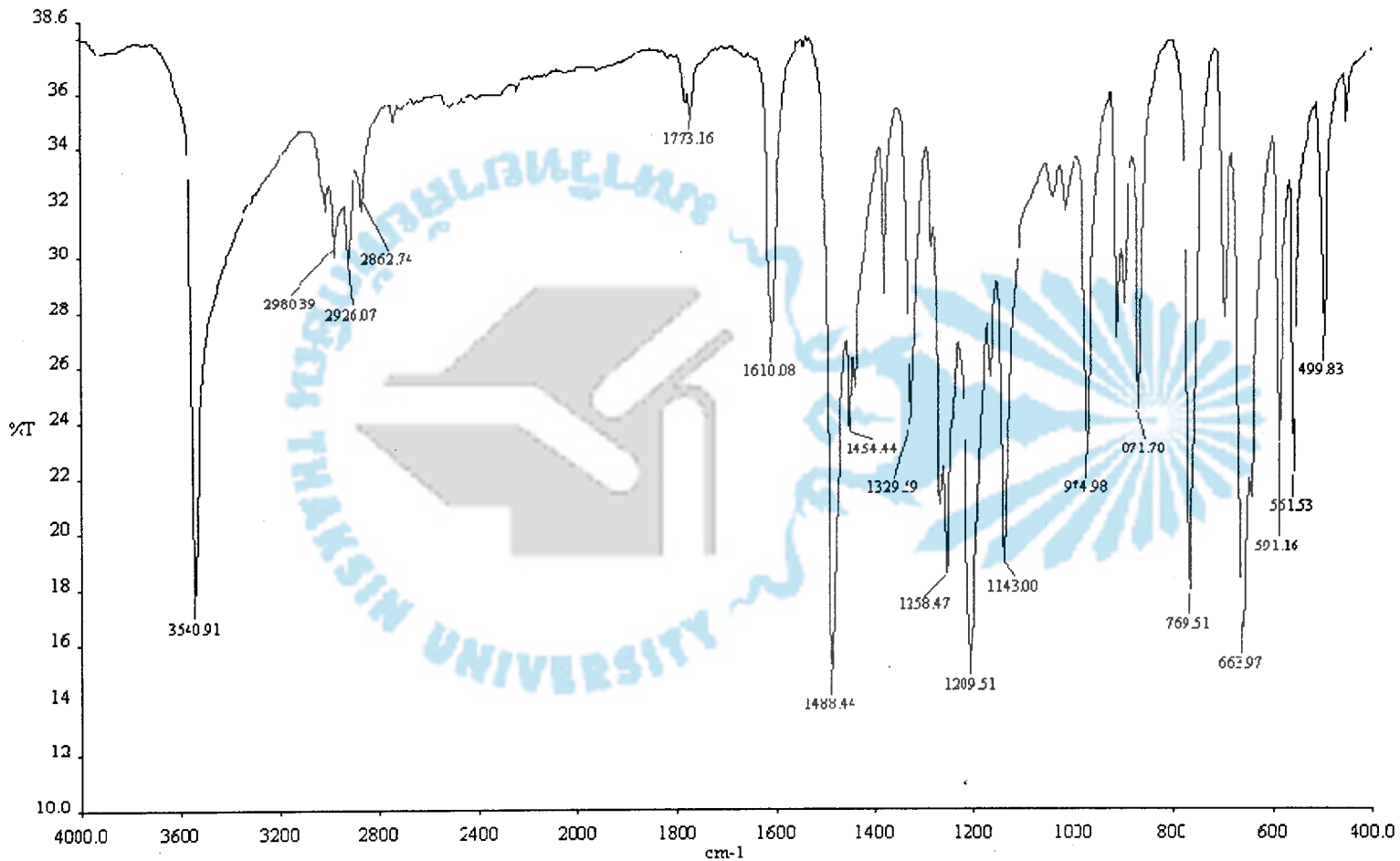
เลขคลื่น (cm^{-1})	หมู่ฟังก์ชัน
3311	N-H of secondary amine
3060	$\nu(CH\text{-}sp^2)$
2975	$\nu(CH\text{-}sp^3)$
1380	$\delta(CH_3)$
1301	$\delta(CH_2)$
1092, 1051	C-N
775	δ(OH) out - of - plane

โครงสร้างของสารประกอบ 2-[(Bis-pyridin-2-ylmethyl-amino)-methyl]-6-{[(2-hydroxy-benzyl)-(4-imidazol-1-yl-butyl)-amino]-methyl}-4-methyl-phenol

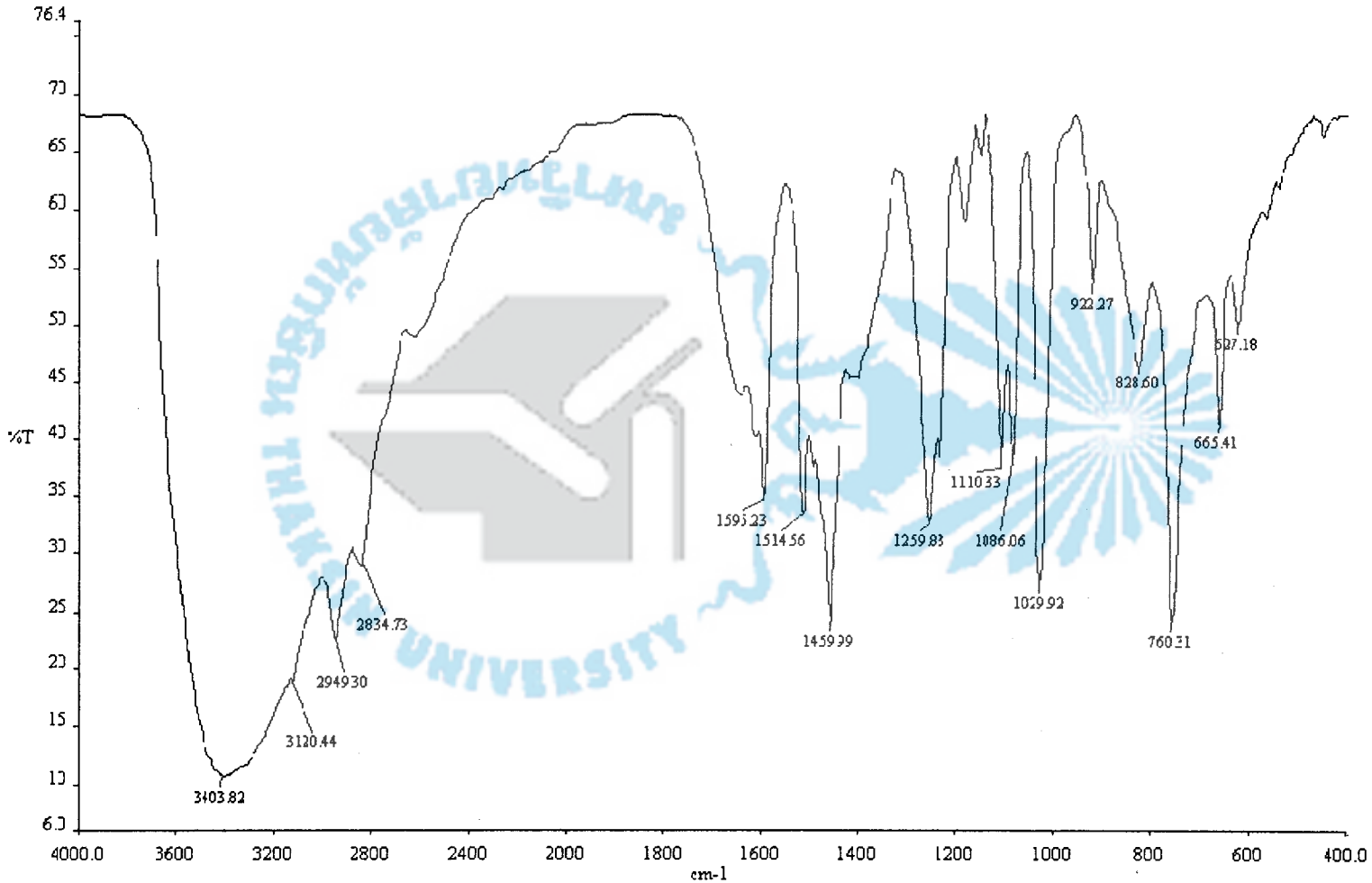


ตารางที่ 6 ข้อมูลอินฟราเรดของสารประกอบ 2-[(Bis-pyridin-2-ylmethyl-amino)-methyl]-6-{[(2-hydroxy-benzyl)-(4-imidazol-1-yl-butyl)-amino]-methyl}-4-methyl-phenol

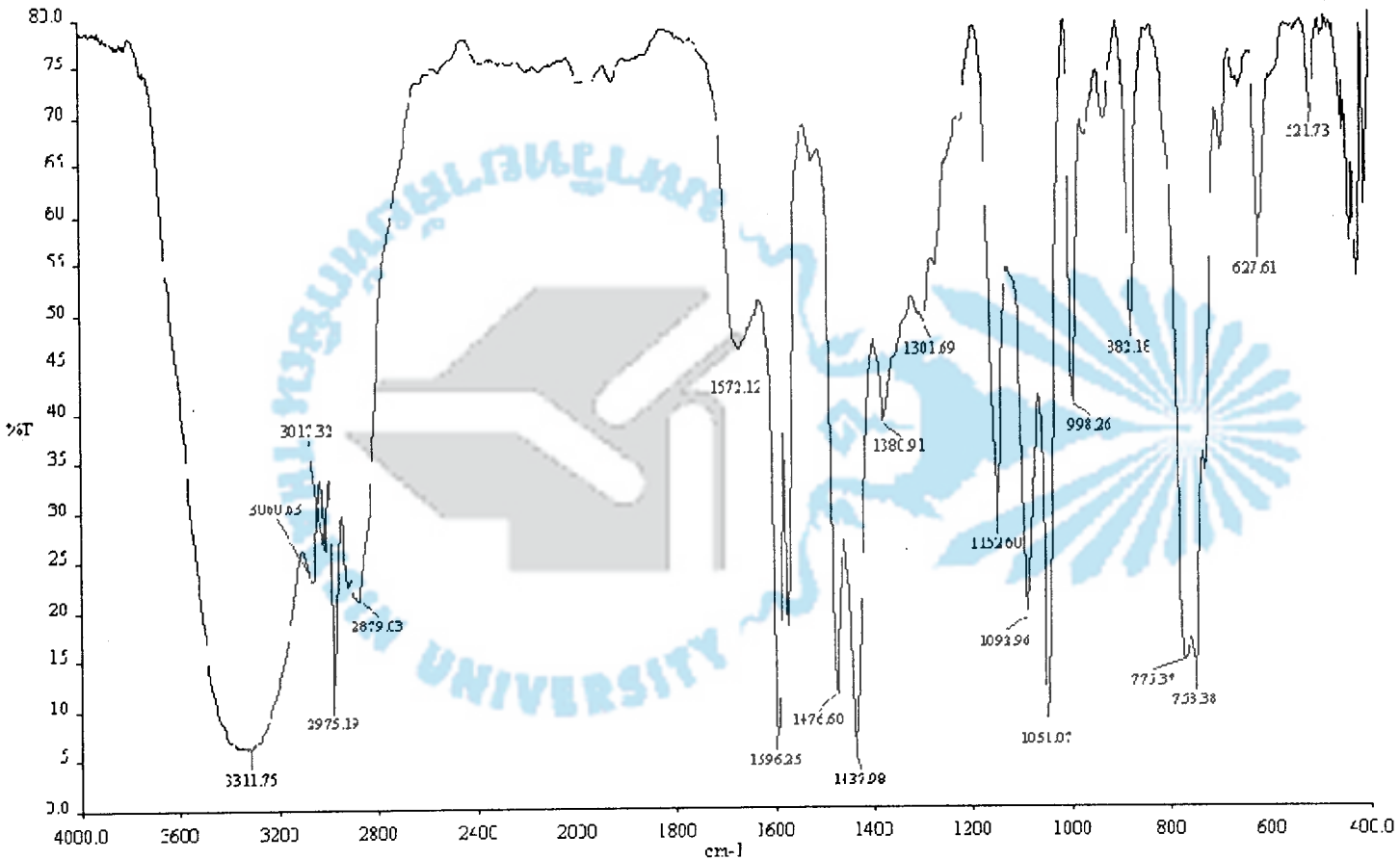
เลขคลื่น (cm^{-1})	หมู่ฟังก์ชัน
3017	$\nu(CH\text{-}sp_2)$
1597	$\nu(C{=}C)$
1459	$\delta(OH)$ in-of-plane
1101,1041	$\nu(C\text{-}O)$
1249	$\delta(CH_2)$
866	$\delta(=CH)$
757	$\delta(C\text{-}H)$ out-of-plane



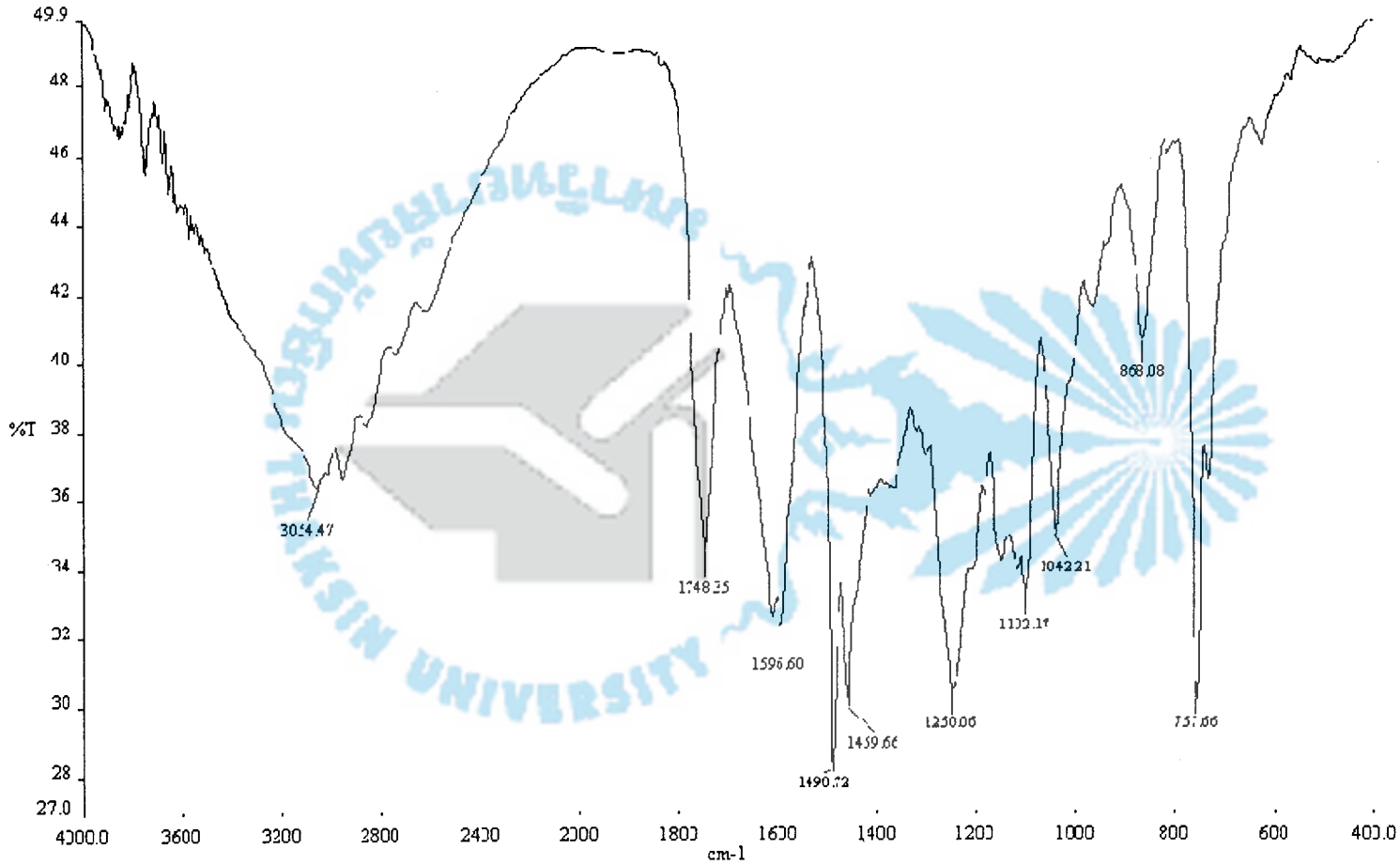
ภาพที่ 3 สเปกตรัม FT-IR ของสารประกอบ2,6-bis(chloromethyl)-4-methyl



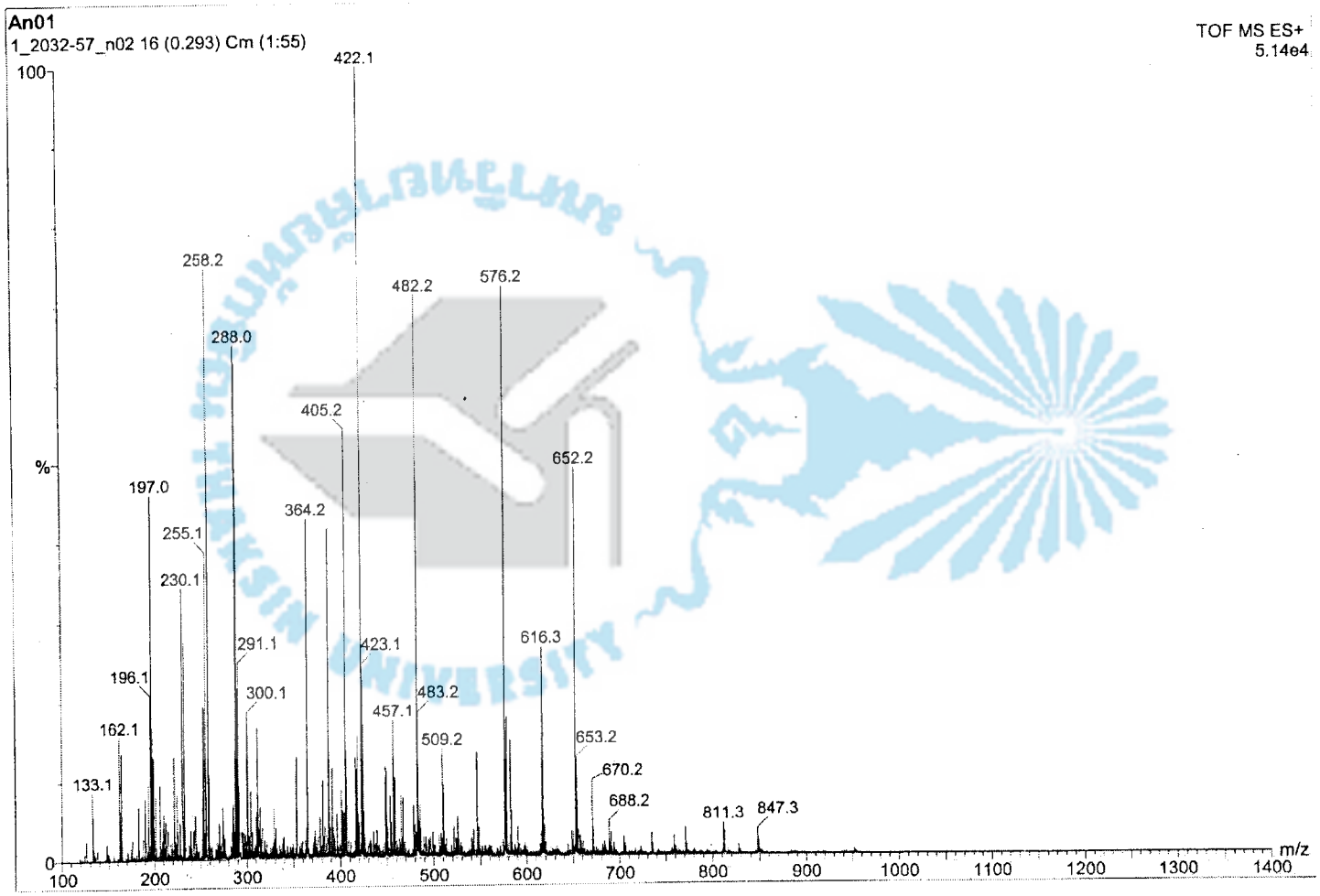
ภาพที่ 4 สเปกตรัม FT-IR ของสารประกอบ 2-[(3-pyrazole-1-yl-propylamino)-methyl]-



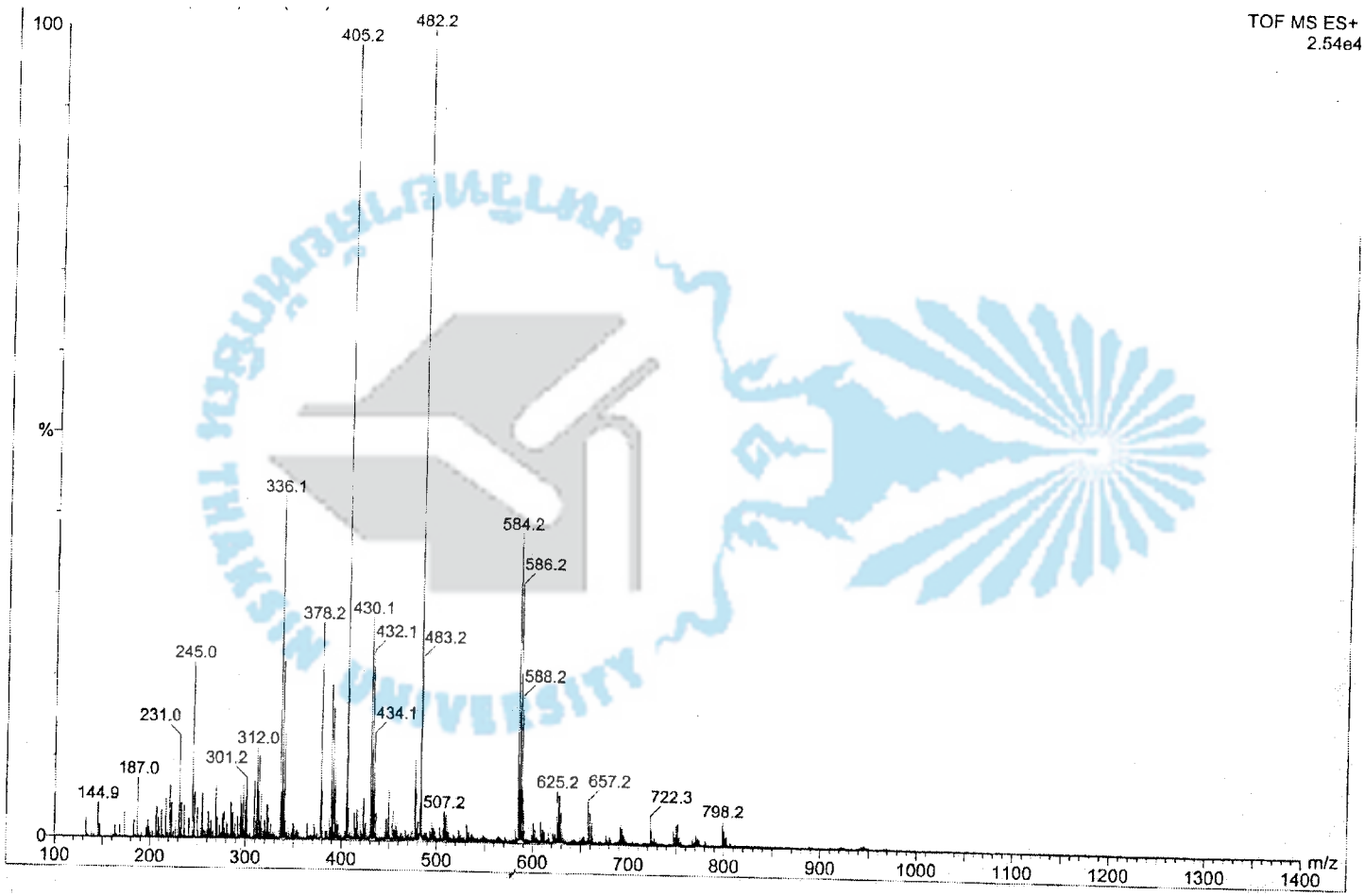
ภาพที่ 5 สเปกตรัม FT-IR ของสารประกอบ 2,2'-Dipicolamine



ภาพที่6 สเปกตรัม FT-IR ของสารประกอบ 2-[(Bis-pyridin-2-ylmethyl-amino)-methyl]-6-{[(2-hydroxy-benzyl)-(4-imidazol-1-yl-butyl)-amino]-methyl}-4-methyl-



ภาพที่7 สเปกตรัม mass ของสารประกอบเชิงซ้อน $[Fe^{III}Fe^{II}(L)(\mu\text{-}O)(H_2O)_2](ClO_4)\cdot H_2O$

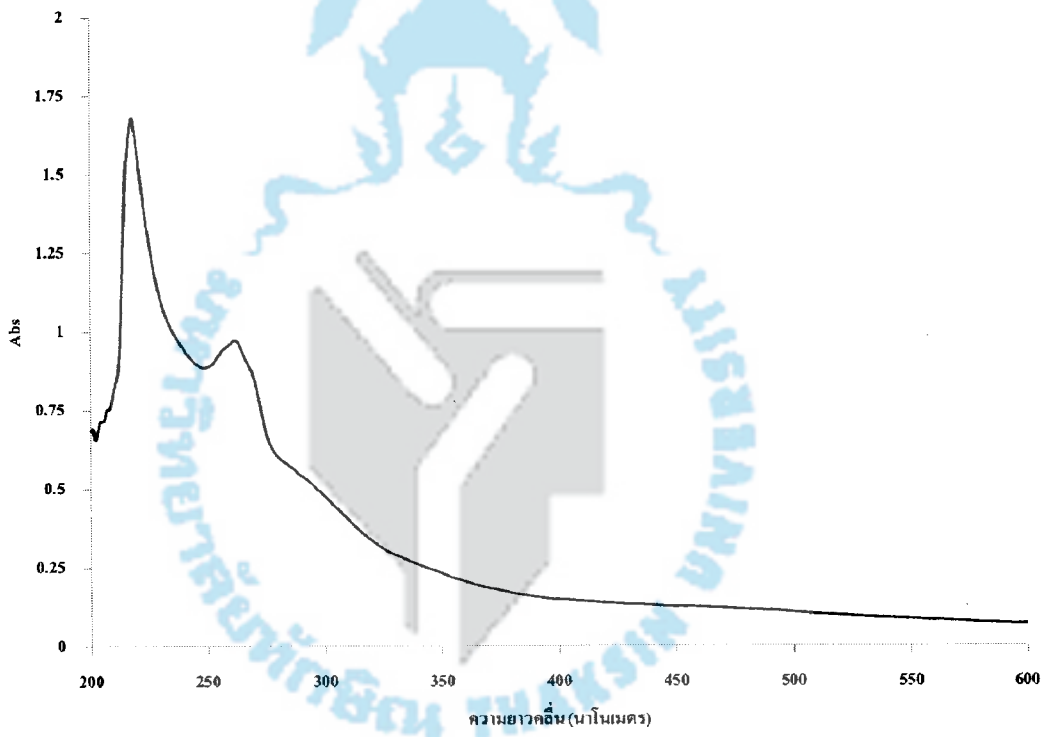


ภาพที่8 สเปกตรัม mass ของสารประกอบเชิงซ้อน $[Fe^{III}Zn^{II}(L)(\mu\text{-}O)(H_2O)](ClO_4)$ (2)

การศึกษาสมบัติทางสเปกโทรสโกปีด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรสโกปี

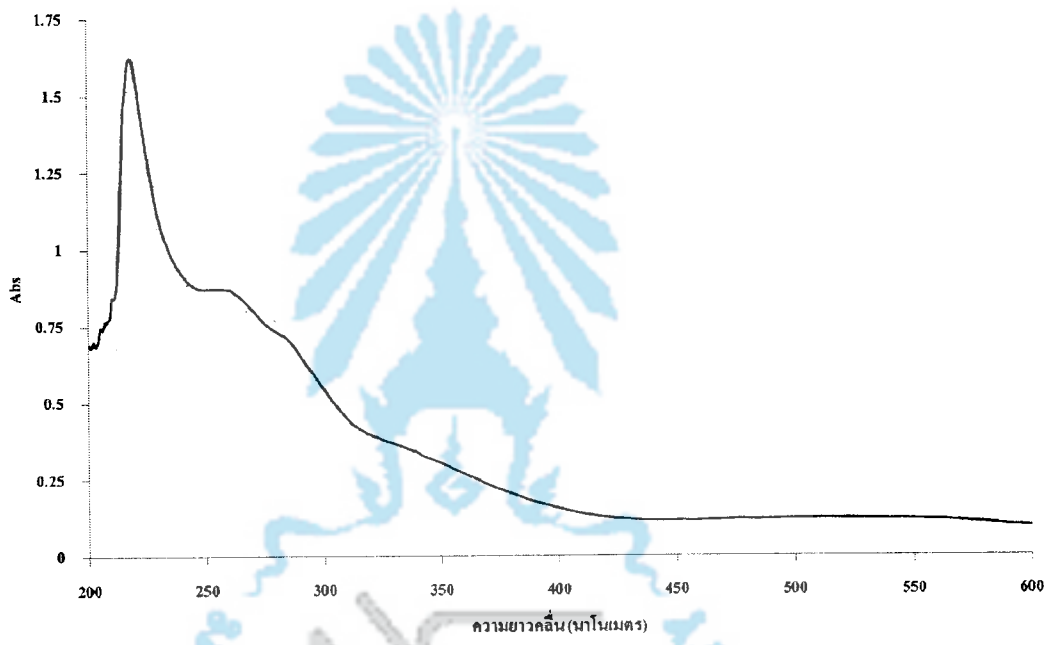
การศึกษาคุณลักษณะของสารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กและสังกะสีกับลิแกนด์มัลติเดนเตตด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรสโกปี เตรียมสารประกอบเชิงซ้อนโดยละลายในตัวทำละลายเมทานอลทำการตรวจวัดที่ช่วงความยาวคลื่น 390 – 800 นาโนเมตร ปรากฏความยาวคลื่นแถบการดูดกลืนสูงสุด ดังภาพที่ 9 -10

สารประกอบเชิงซ้อน	ความยาวคลื่น (nm)	ค่าการดูดกลืนแสง
$[Fe^{III}Fe^{II}(L)(\mu\text{-}O)(H_2O)_2](ClO_4)\cdot H_2O$ (1)	218	1.6812
	262	0.9722



ภาพที่ 9 สเปกตรัม UV ของสารประกอบเชิงซ้อน $[Fe^{III}Fe^{II}(L)(\mu\text{-}O)(H_2O)_2](ClO_4)\cdot H_2O$ **(1)**

สารประกอบเชิงซ้อน	ความยาวคลื่น (nm)	ค่าการดูดกลืนแสง
$[Fe^{III}Zn^{II}(L)(\mu\text{-}O)(H_2O)](ClO_4)$ (2)	218	1.6219
	255	0.8708



ภาพที่ 10 สเปกตรัม UV ของสารประกอบเชิงซ้อน $[Fe^{III}Zn^{II}(L)(\mu\text{-}O)(H_2O)](ClO_4)$ **(2)**

การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรีย *E. coli* และ *S. aureus*

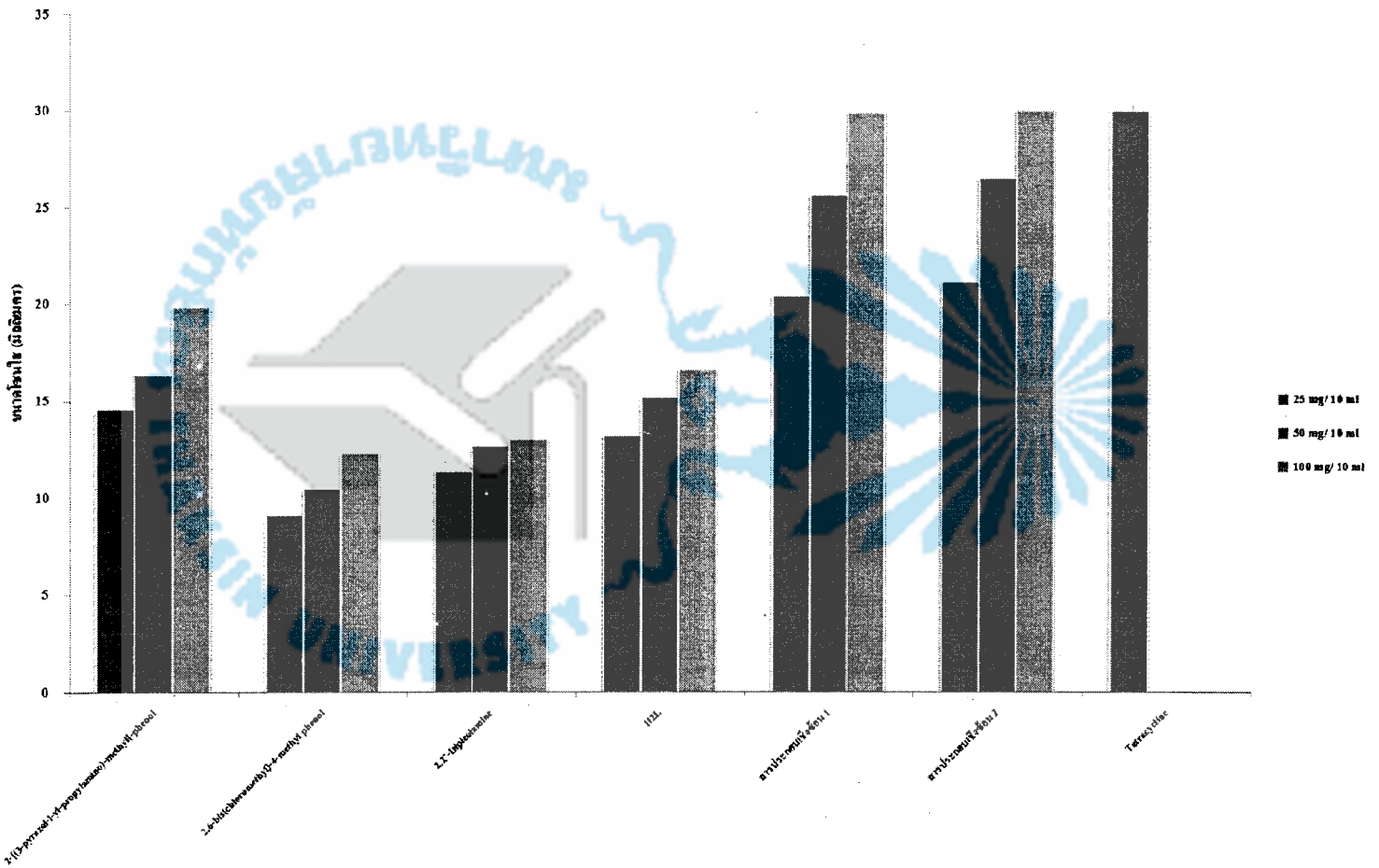
การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียคือ *E. coli* และ *S. aureus* ที่ระดับความเข้มข้นของสารประกอบเชิงซ้อนและสารตั้งต้น 3 ระดับ คือ 25, 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อ 10 มิลลิลิตร โดยใช้ตัวทำละลายเมทานอลเป็นตัวควบคุม ผลการทดลองดังตารางที่ 7 - 8

ตารางที่ 7 ฤทธิ์ในการยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรีย *S. aureus* ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

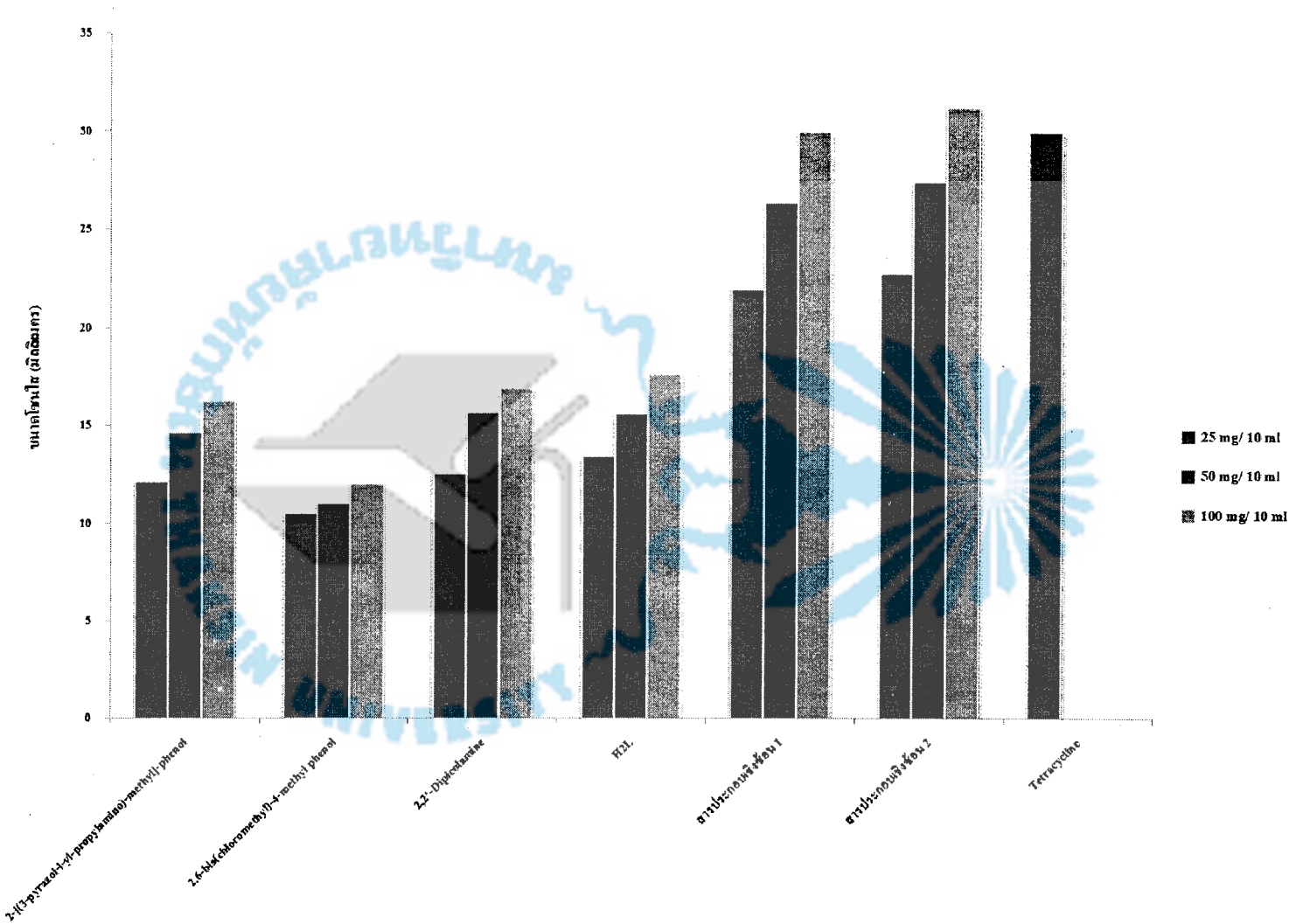
สารประกอบ	ขนาดโซนใส (มิลลิเมตร) ในการยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* (+)		
	25 mg/10 ml	50 mg/10 ml	100 mg/10 ml
2-[(3-pyrazol-l-yl-propylamino)-methyl]-phenol	14.60 ± 0.30	16.35 ± 0.66	19.90 ± 0.00
2,6-bis(chloromethyl)-4-methylphenol	9.10 ± 0.00	10.50 ± 0.21	12.30 ± 0.41
2,2'-Dipicolamine	11.34 ± 0.15	12.65 ± 0.30	13.00 ± 0.05
H_2L	13.20 ± 0.25	15.15 ± 0.45	16.60 ± 0.00
สารประกอบเชิงซ้อน 1	20.40 ± 0.23	25.65 ± 0.00	29.90 ± 0.31
สารประกอบเชิงซ้อน 2	21.10 ± 0.55	26.50 ± 0.20	30.01 ± 0.50
Tetracycline	30.00 ± 0.00		

ตารางที่ 8 ฤทธิ์ในการยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรีย *E. coli* (-) ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

สารประกอบ	ขนาดโซนใส (มิลลิเมตร) ในการยับยั้งแบคทีเรีย *E. coli (-)*		
	25 mg/10 ml	50 mg/10 ml	100 mg/10 ml
2-[(3-pyrazol-l-yl-propylamino)-methyl]-phenol	12.11 ± 0.10	14.65 ± 0.00	16.30 ± 0.15
2,6-bis(chloromethyl)-4-methylphenol	10.50 ± 0.35	11.00 ± 0.40	12.01 ± 0.22
2,2'-Dipicolamine	12.55 ± 0.52	15.71 ± 0.12	16.92 ± 0.47
H_2L	13.42 ± 0.14	15.60 ± 0.78	17.65 ± 0.32
สารประกอบเชิงซ้อน 1	22.00 ± 0.87	24.50 ± 0.36	27.01 ± 0.00
สารประกอบเชิงซ้อน 2	22.78 ± 0.60	27.45 ± 0.54	31.25 ± 0.95
Tetracycline	30.00 ± 0.00		



ภาพที่11 ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ของสารประกอบเชิงซ้อน **1** และ **2**



ภาพที่ 12 ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ของสารประกอบเชิงซ้อน **1** และ **2**

บทที่ 5
สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการศึกษา

การสังเคราะห์ลิแกนด์ H_2L และการสังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อน M_1M_2L ที่มี H_2L เป็นลิแกนด์มัลติเดนเตต (Multidentate ligand) เริ่มต้นจากการสังเคราะห์สารประกอบตั้งต้น Salicyladehyde ทำปฏิกิริยากับ 1-(3-aminopropyl)imidazole ได้สารประกอบ 2-[(3-pyrazol-l-yl-propylamino)-methyl]-phenol จากนั้นเตรียม 2,6-bis(chloromethyl)-4-methyl phenol จากการทำปฏิกิริยาระหว่าง 2,6-bis(hydroxymethyl)-4-methyl phenol และกรดเกลือเข้มข้น และเตรียม 2,2'-Dipicolamine จากการทำปฏิกิริยาระหว่าง 2-(Aminomethyl)-pyridine และ 2-Pyridine carboxaldehyde จากนั้นนำสารประกอบที่เตรียมได้ทั้งสามชนิดมาทำปฏิกิริยาด้วยกันจะได้สารประกอบ 2-[(Bis-pyridin-2-ylmethyl-amino)-methyl]-6-{[(2-hydroxy-benzyl)-(4-imidazol-1-yl-butyl)-amino]-methyl}-4-methyl-phenol (H_2L) ซึ่งเป็นลิแกนด์ที่ต้องการแล้วทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟฟี และสังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อน M_1M_2L การสังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อน M_1M_2L จะใช้สารตั้งต้นซึ่งเป็นเกลือของเหล็ก(III) และ เหล็ก(II) สำหรับสารประกอบเชิงซ้อน **1** และเหล็ก(III) และสังกะสี(II) สำหรับสารประกอบเชิงซ้อน **2** ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิที่ประมาณ 60 องศาเซลเซียส และ L = ไอออนลบของ 2-[(Bis-pyridin-2-ylmethyl-amino)-methyl]-6-{[(2-hydroxy-benzyl)-(4-imidazol-1-yl-butyl)-amino]-methyl}-4-methyl-phenol จากนั้นศึกษาสมบัติทางเคมีและตรวจหาลักษณะโครงสร้างของสารประกอบเชิงซ้อน **1** และ **2** โดยวิธีสเปกโทรสโกปี เช่น ฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรมิเตอร์ (FT-IR) ในช่วงเลขคลื่น 4000 – 400 cm^{-1} เครื่องวิเคราะห์หามวลโมเลกุล ด้วยเครื่อง Liquid Chromatograph – Mass Spectrometer โดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายและทำให้เกิดการแตกตัวเป็นไอออนด้วยวิธี Electro Spray Ionization (ESI) อัลตราไวโอเลต - วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (UV-Vis) ช่วงความยาวคลื่นตั้งแต่ 200 - 800 นาโนเมตรเป็นต้น พบว่าสารประกอบเชิงซ้อนทั้งสองชนิดมีสูตรโมเลกุลเป็น $[Fe^{III}Fe^{II}(L)(\mu\text{-}O)(H_2O)_2](ClO_4)\cdot H_2O$ **(1)** และ $[Fe^{III}Zn^{II}(L)(\mu\text{-}O)(H_2O)](ClO_4)$ **(2)** ซึ่งสารประกอบเชิงซ้อนทั้งสองชนิดมีรูปทรงทางเรขาคณิตแบบทรงเหลี่ยมแปดหน้ารอบอะตอมของโลหะเหล็ก(III) และเหล็ก(II) ยกเว้นที่สังกะสี(II) ได้ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารประกอบเชิงซ้อนดังกล่าวเทียบกับลิแกนด์โดยแบคทีเรียที่ใช้แบ่งเป็นชนิดแกรมบวกและแกรมลบ แบคทีเรียแกรมบวกที่ใช้คือ *S. aureus* และแบคทีเรียแกรมลบที่ใช้คือ *E. coli* โดยความเข้มข้นของสารที่ทำการทดสอบมี 3 ความเข้มข้นคือ 25 มิลลิกรัมต่อ 10 มิลลิลิตร, 50 มิลลิกรัมต่อ 10 มิลลิลิตร และ 100 มิลลิกรัมต่อ 10 มิลลิลิตร ซึ่งใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย จากนั้นนำจานเพาะเชื้อดังกล่าวไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการเก็บข้อมูลการยับยั้งดังกล่าวโดยการวัดขนาดของวงใสซึ่งเป็นบริเวณที่แบคทีเรียไม่

มีการเจริญเติบโตและผลการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแสดงให้เห็นว่าสารประกอบเชิงซ้อนมีประสิทธิภาพในการยับยั้งชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดที่ดีกว่าลิแกนด์อิสระที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน

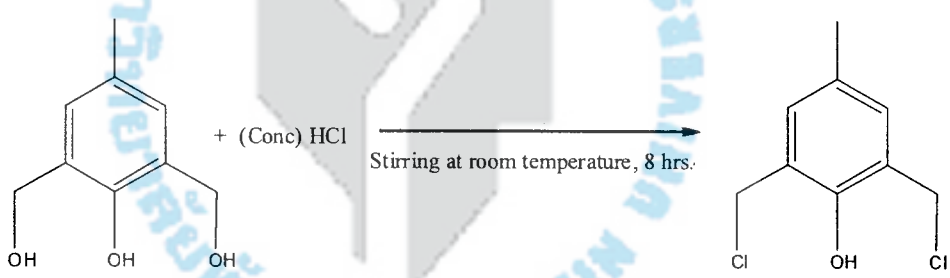
อภิปรายผล

สังเคราะห์ลิแกนด์ H_2L และสารประกอบเชิงซ้อน M_1M_2L เมื่อ M_1 คือ Fe(III) และ M_2 คือ Fe(II) และ Zn(II) ศึกษาสมบัติทางเคมีและตรวจหาโครงสร้างของสารประกอบเชิงซ้อนที่สังเคราะห์ได้โดยวิธี สเปกโทรสโกปี เช่น IR, UV-vis และ Mass spectrometry เป็นต้นให้ผลการทดลองทางเคมีในแต่ละเทคนิคสรุปได้ดังนี้

การศึกษาสมบัติทางสเปกโทรสโกปีด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี

เมื่อโมเลกุลของ M_1M_2L ที่มี H_2L เป็นลิแกนด์มัลติเดนเตต ได้รับคลื่นอินฟราเรดในช่วงที่เหมาะสม จะทำให้พันธะภายในโมเลกุลเกิดการสั่นปรากฏออกมาเป็นสัญญาณความถี่เป็นแถบการดูดกลืนเกิดขึ้น โดยแกนนอนจะเป็นเลขคลื่น (cm^{-1}) และแกนตั้งเป็นเปอร์เซ็นต์การส่องผ่าน (% Transmittance) จากโครงสร้างของสารประกอบเชิงซ้อนที่สังเคราะห์ สรุปแถบการดูดกลืนให้ผลดังนี้

การศึกษาสมบัติทางสเปกโทรสโกปีด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโทรสโกปีของสารประกอบ 2,6-bis(chloromethyl)-4-methyl phenol

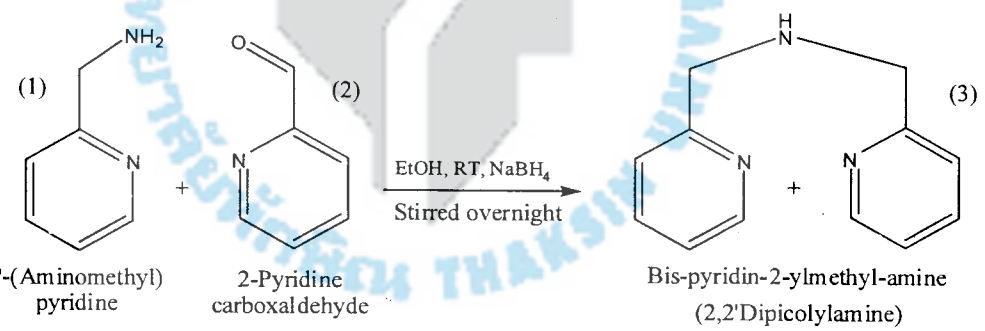


จากข้อมูลสเปกตรัมอินฟราเรดของสารประกอบ 2,6-bis(chloromethyl)-4-methyl phenol แสดงให้เห็นถึงลักษณะของสเปกตรัมที่ปรากฏสัญญาณของหมู่ฟังก์ชั่นของสารประกอบดังกล่าวมีลักษณะใกล้เคียงกับสารตั้งต้น 2,6-bis(hydroxymethyl)-p-cresol ที่ใช้

การศึกษาสมบัติทางสเปกโทรสโกปีด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโทรสโกปีของสารประกอบ 2-[(3-pyrazol-l-yl-propylamino)-methyl]-phenol

ข้อมูลสเปกตรัมอินฟราเรดของสารประกอบ 2-[(3-pyrazol-l-yl-propylamino)-methyl]-phenol แสดงให้เห็นสัญญาณของเอมีนชนิดทุติยภูมิที่ปรากฏขึ้นเนื่องจากการเกิดปฏิกิริยา condensation ระหว่าง 1-(3-aminopropyl)imidazole กับ salicylaldehyde ในตัวทำละลายเอทานอล ทำให้เกิดเป็นสารประกอบอิมีนขึ้น หลังจากนั้นมีการเติม $NaBH_4$ ลงไปเพื่อไปทำหน้าที่เป็นตัวรีดิวซ์หรือการเพิ่มไฮโดรเจนให้กับโมเลกุล ซึ่งเดิมสเปกตรัมของสารตั้งต้น 1-(3-aminopropyl)imidazole จะปรากฏสัญญานของเอมีนชนิดปฐมภูมิที่มีจำนวนสัญญาณการยืด-หดของ N-H 2 พีค แต่ในสเปกตรัมของสารประกอบที่สังเคราะห์จะปรากฏสัญญานของ N-H เพียง 1 พีคเท่านั้น โดยลักษณะดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงลักษณะของโครงสร้างที่มีเอมีนชนิดทุติยภูมิอยู่ด้วย

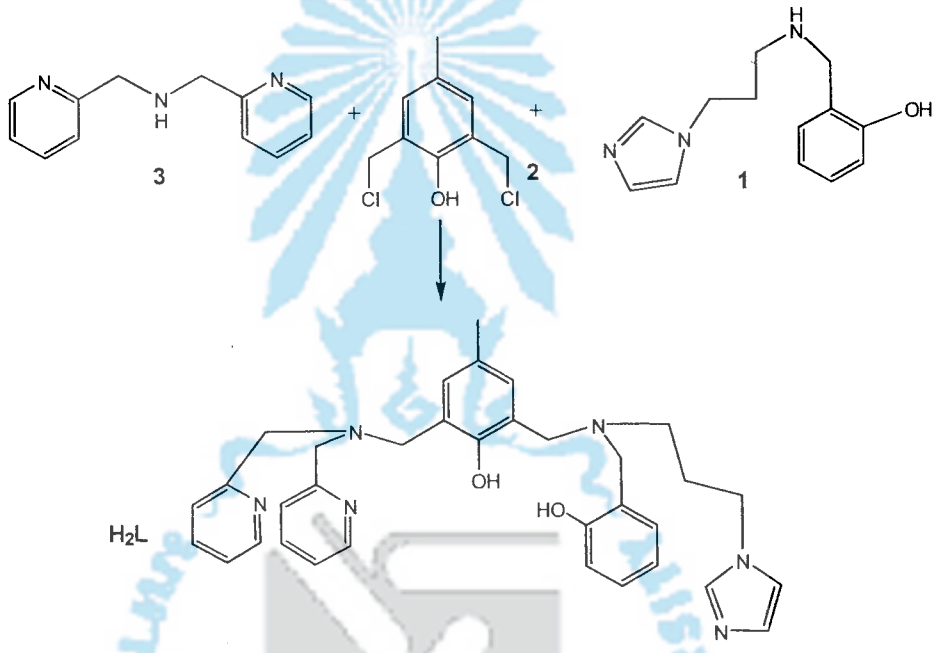
การศึกษาสมบัติทางสเปกโทรสโกปีด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโทรสโกปีของสารประกอบ 2,2'-Dipicolamine



ข้อมูลอินฟราเรดสเปกตรัมของสารประกอบ 2,2'-Dipicolamine จากการทำปฏิกิริยาของ 2-(aminomethyl)pyridine กับ 2-Pyridine carboxaldehyde ข้อมูลสเปกตรัมของ FT-IR ไม่ปรากฏสัญญานของ C=O ในผลิตภัณฑ์ เนื่องจากการเตรียมสารประกอบดังกล่าวทำการเตรียมปฏิกิริยา Condansation ทำให้เกิดเป็นสารประกอบอิมีนขึ้น หลังจากนั้นมีการเติม $NaBH_4$ ลงไปเพื่อไปทำหน้าที่เป็นตัวรีดิวซ์หรือการเพิ่มไฮโดรเจนให้กับโมเลกุลที่เกิดการทำปฏิกิริยากันระหว่าง C=O

ของอัลดีไฮด์กับเอมีนชนิดทุติยภูมิ ส่วนลักษณะแถบการดูดกลืนอื่นๆของสารประกอบดังกล่าวมีลักษณะใกล้เคียงกับสารตั้งต้นที่ใช้ในการเตรียม

การศึกษาสมบัติทางสเปกโทรสโกปีด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโทรสโกปีของ 2-[(Bis-pyridin-2 -ylmethyl-amino)-methyl]-6 -{[(2 -hydroxy-benzyl)-(4 -imidazol-1 -yl-butyl)-amino]-methyl}-4-methyl-phenol (H_2L)

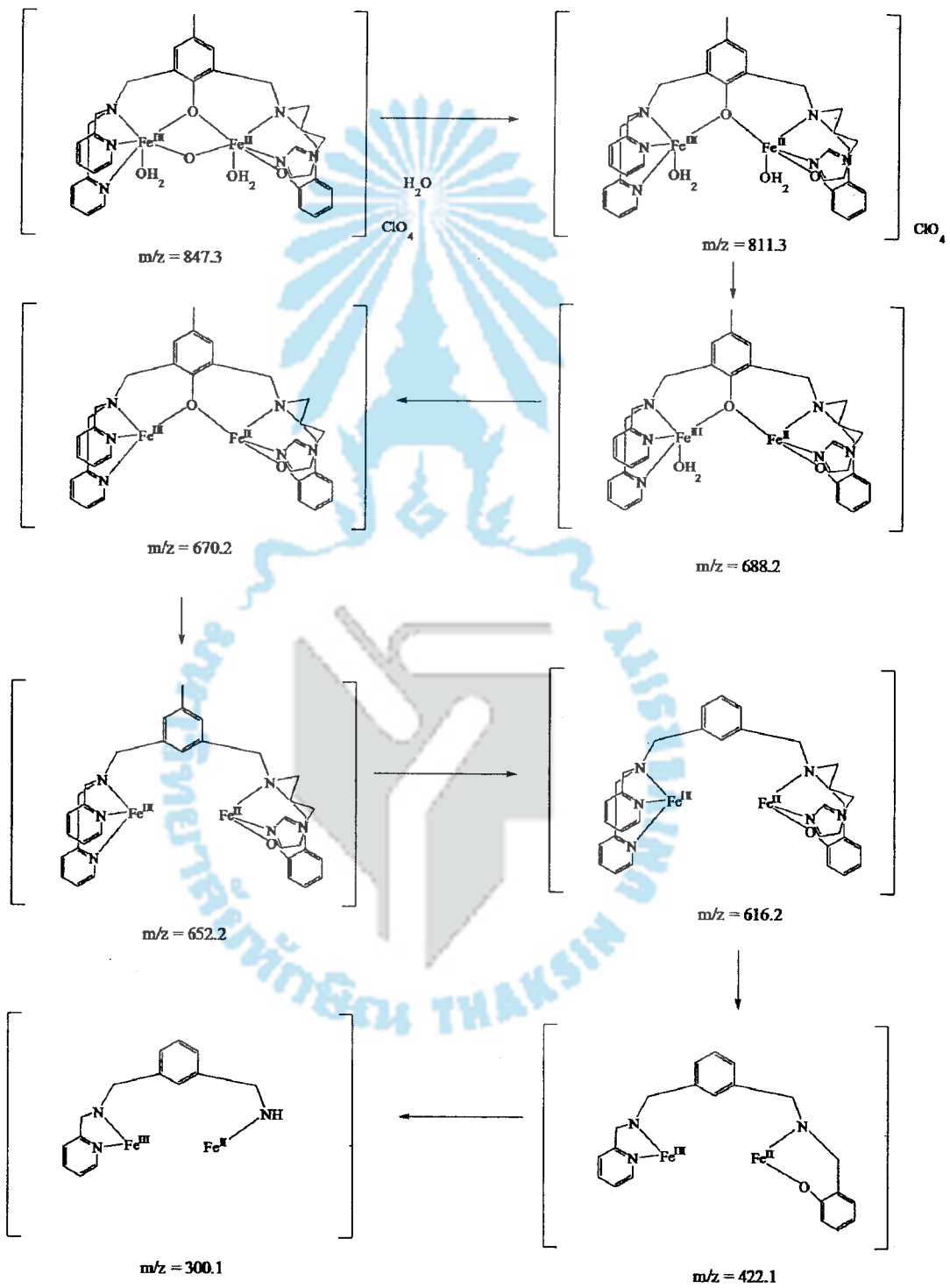


ข้อมูลอินฟราเรดของ 2-[(Bis-pyridin-2-ylmethyl-amino)-methyl]-6-{[(2-hydroxy-benzyl)-(4-imidazol-1-yl-butyl)-amino]-methyl}-4-methyl-phenol ปรากฏสัญญานที่สำคัญดังนี้ 3017 cm-1 เป็นแถบการดูดกลืนแสงของหมู่ฟังก์ชัน CH-sp^2 ที่ 1597 cm^{-1} เป็นแถบการดูดกลืนแสงของหมู่ฟังก์ชัน C=C ที่ 1459 cm^{-1} เป็นแถบการดูดกลืนแสงของหมู่ฟังก์ชัน(OH) in - of – plane ที่ 1101, 1041 cm^{-1} เป็นแถบการดูดกลืนแสงของหมู่ฟังก์ชัน (C-O) ที่ 1249 cm^{-1} เป็นแถบการดูดกลืนแสงของหมู่ฟังก์ชัน(CH_2) ที่ 866 cm^{-1} เป็นแถบการดูดกลืนแสงของหมู่ฟังก์ชัน =CH และ 757 cm^{-1} เป็นแถบการดูดกลืนแสงของหมู่ฟังก์ชัน (C-H) out - of - plane ซึ่งข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงโครงสร้างลิแกนด์มัลติเดนเทตที่ได้เป็นดังสมการข้างต้น

การศึกษาสมบัติด้วยเทคนิค Mass spectrometry

จากการศึกษามวลโมเลกุลของสารประกอบเชิงซ้อน$[Fe^{III}Fe^{II}(L)(\mu\text{-}O)(H_2O)_2](ClO_4)\cdot H_2O$ **(1)** ด้วยเทคนิค Liquid Chromatograph – Mass Spectrometer โดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายและ

ทำให้เกิดการแตกตัวเป็นไอออนด้วยวิธี Electro Spray Ionization (ESI) สามารถเขียนกลไกการแตกตัวของสารประกอบเชิงซ้อนดังกล่าวได้ ดังนี้



จากภาพแสดงการแตกตัวของสารประกอบเชิงซ้อน 1 พบสัญญานการแตกตัวสามครั้ง เขียนเป็นสมการได้ดังนี้

$m/z = 847.3 \rightarrow [Fe^{III}Fe^{II}(L)(\mu\text{-}O)(H_2O)_2](ClO_4)\cdot H_2O$

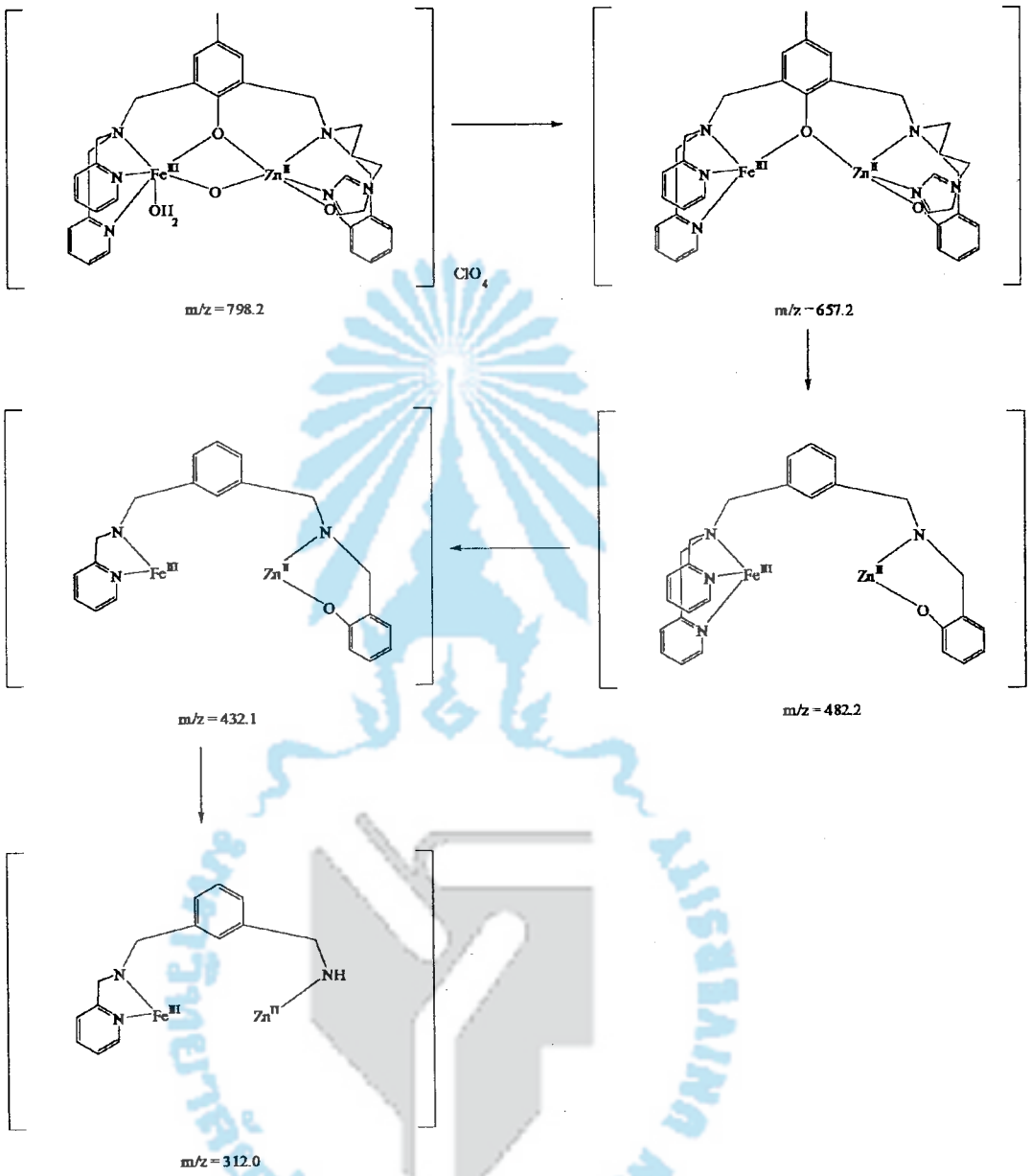
$m/z = 811.3 \rightarrow [Fe^{III}Fe^{II}(L)(H_2O)_2](ClO_4)$

$m/z = 688.2 \rightarrow [Fe^{III}Fe^{II}(L)(H_2O)]$

$m/z = 670.2 \rightarrow [Fe^{III}Fe^{II}(L)]$

ส่วนการแตกตัวที่เหลือเป็นการแตกตัวในบางหมู่ฟังก์ชั่นของมัลติเดนเตตลิแกนด์ (H_2L) ดังแสดงในแผนภาพ

การศึกษามวลโมเลกุลของสารประกอบเชิงซ้อน $[Fe^{III}Zn^{II}(L)(\mu\text{-}O)(H_2O)](ClO_4)$ **(2)** ด้วยเทคนิค Liquid Chromatograph – Mass Spectrometer โดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายและทำให้เกิดการแตกตัวเป็นไอออนด้วยวิธี Electro Spray Ionization (ESI) สามารถเขียนกลไกการแตกตัวของสารประกอบเชิงซ้อนดังกล่าวได้ดังนี้



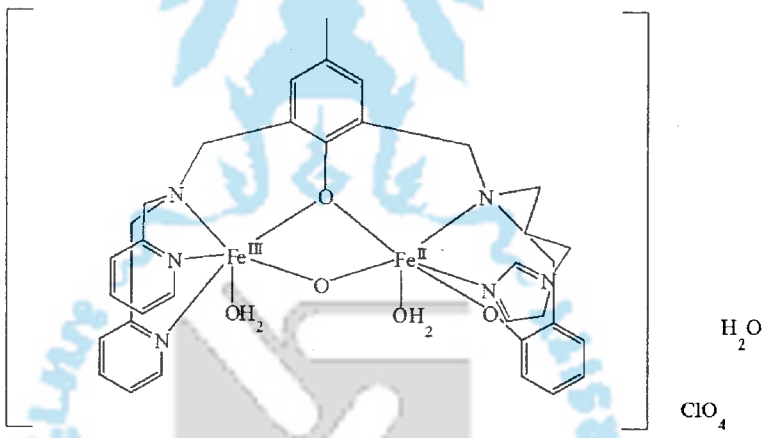
m/z = 798.2 → $[Fe^{III}Zn^{II}(L)(\mu\text{-}O)(H_2O)](ClO_4)$

m/z = 811.3 → $[Fe^{III}Zn^{II}(L)]$

ส่วนการแตกตัวที่เหลือเป็นการแตกตัวในบางหมู่ฟังก์ชั่นของมัลติเดนเตตลิแกนด์ (H_2L) ดังแสดงในแผนภาพ

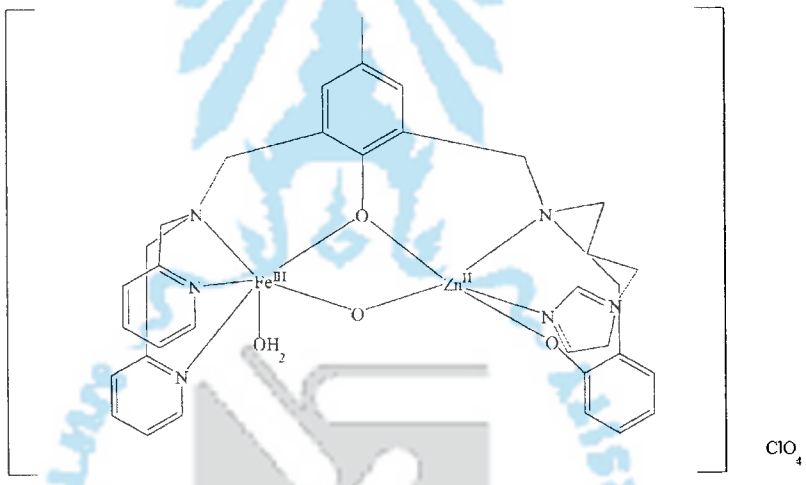
การศึกษาสมบัติทางสเปกโทรสโกปีด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรสโกปี

สเปกตรัมการดูดกลืนคลื่นแสงวิสิเบิลในช่วงความยาวคลื่น 400-800 นาโนเมตรของสารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กและสังกะสีกับลิแกนด์มัลติเดนเตตทั้งสองชนิด ในตัวทำละลายเมทานอล ปรากฏสัญญาณค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 262 นาโนเมตรในสารประกอบเชิงซ้อน **1** และที่ 255 นาโนเมตรในสารประกอบเชิงซ้อน **2** ซึ่งแสดงให้เห็นถึงลักษณะการเกิดแทรนซิชันแบบ $n \rightarrow \pi^*$ และสัญญาณค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 218 นาโนเมตรในสารประกอบเชิงซ้อน **1** และ **2** ซึ่งแสดงให้เห็นถึงลักษณะการเกิดแทรนซิชันแบบ $\pi \rightarrow \pi^*$ ของวงเบนซีนในโมเลกุลของลิแกนด์ H_2L โดยสเปกตรัมของสารประกอบเชิงซ้อนมีลักษณะที่ใกล้เคียงกัน (Athanassios K. 2007 : 5132–5139)



จากข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีและข้อมูลการวิเคราะห์หามวลโมเลกุล พบว่า โครงสร้างของสารประกอบเชิงซ้อน **1** มีสูตรโมเลกุล คือ $C_{34}H_{43}N_6O_9Fe_2Cl$ มีสูตรทางเคมี คือ $[Fe^{III}Fe^{II}(L)(\mu\text{-}O)(H_2O)_2](ClO_4)\cdot H_2O$ โครงสร้างโมเลกุลมีลักษณะดังภาพ โดยในโคออร์ดิเนชันสเฟียร์ H_2L ทำหน้าที่เป็นลิแกนด์ชนิดมัลติเดนเตตลิแกนด์ อะตอมของ Fe(III) และ Fe(II) มีการสร้างพันธะโคออร์ดิเนตโคเวเลนต์กับลิแกนด์ H_2L คือ อะตอมของ Fe(III) สร้างพันธะโคออร์ดิเนตโคเวเลนต์กับไนโตรเจน 3 อะตอมซึ่งมาจากไนโตรเจนของวงไพริดีน 2 วง ไนโตรเจนอีก 2 อะตอมจากเอมีนตติยะภูมิ และโคออร์ดิเนตกับออกซิเจน 3 อะตอม ซึ่งสองอะตอมมาจากน้ำ 1 โมเลกุล หนึ่งอะตอมของออกซิเจนจากออกซิเจนที่ทำหน้าที่เป็นลิแกนด์สะพาน และ 1 อะตอมออกซิเจนของลิแกนด์ จาก 2-[(Bis-pyridin-2-ylmethyl-amino)-methyl]-6-{[(2-hydroxy-benzyl)-(4-imidazol-1-yl-butyl)-amino]-methyl}-4-methyl-phenol ส่วนอะตอมของ Fe(II) สร้างพันธะโคออร์ดิเนตโคเวเลนต์กับไนโตรเจน 2 อะตอมซึ่งมาจากไนโตรเจนของวงอิมิดาโซล 1 วง ไนโตรเจนอีก 1 อะตอม

จากเอมีนตติยะภูมิ และโคออร์ดิเนตกับออกซิเจน 4 อะตอม โดย 1 อะตอมของออกซิเจนมาจากหมู่ไฮดรอกซิลของลิแกนด์ H_2L และ 1 อะตอมของออกซิเจนมาจากน้ำ 1 โมเลกุล หนึ่งอะตอมของออกซิเจนจากออกซิเจนที่ทำหน้าที่เป็นลิแกนด์สะพาน และ1 อะตอมออกซิเจนของลิแกนด์ จาก 2-[(Bis-pyridin-2 -ylmethyl-amino)-methyl]-6 -{[(2 -hydroxy-benzyl)-(4 -imidazol-1 -yl-butyl)-amino]-methyl}-4-methyl-phenol โดยอะตอมของ Fe(III) และ Fe(II) แต่ละอะตอมมีเลขโคออร์ดิเนชันเท่ากับ 6 รูปทรงทางเรขาคณิตโดยรอบของ Fe(III) และ Fe(II) เป็นออกตะฮีดรอลบิดเบี้ยว ส่วนนอกโคออร์ดิเนชันสเฟียร์ประกอบด้วยโมเลกุลของเปอร์คลอเรต 1 โมเลกุลทำหน้าที่เป็นเคาร์เตอร์ไอออนและมีน้ำอยู่นอกโคออร์ดิเนชันสเฟียร์อยู่ทั้งหมด 1 โมเลกุล



จากข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีและข้อมูลการวิเคราะห์หามวลโมเลกุล พบว่า โครงสร้างของสารประกอบเชิงซ้อน 2 มีสูตรโมเลกุล คือ $C_{34}H_{36}N_6O_8FeZnCl$ มีสูตรทางเคมี คือ $[Fe^{III}Zn^{II}(L)(\mu\text{-}O)(H_2O)](ClO_4)$ โครงสร้างโมเลกุลมีลักษณะดังภาพ ในโคออร์ดิเนชันสเฟียร์ H_2L ทำหน้าที่เป็นลิแกนด์ชนิดมัลติเดนเตตเชื่อมโยง Fe(II) และZn(II) เข้าด้วยกัน อะตอมของ Fe(III) และ Zn(II) มีการสร้างพันธะโคออร์ดิเนตโคเวเลนต์กับลิแกนด์ H_2L คือ อะตอมของ Fe(III) สร้างพันธะโคออร์ดิเนตโคเวเลนต์กับไนโตรเจน 3 อะตอมซึ่งมาจากไนโตรเจนของวงไพริดีน 2 วง ไนโตรเจนอีก 2 อะตอมจากเอมีนตติยะภูมิ และโคออร์ดิเนตกับออกซิเจน 3 อะตอม ซึ่งสองอะตอมมาจากน้ำ 1 โมเลกุล หนึ่งอะตอมของออกซิเจนจากออกซิเจนที่ทำหน้าที่เป็นลิแกนด์สะพาน และ1 อะตอมออกซิเจนของลิแกนด์ จาก 2-[(Bis-pyridin-2-ylmethyl-amino)-methyl]-6-{[(2-hydroxy-benzyl)-(4-imidazol-1-yl-butyl)-amino]-methyl}-4-methyl-phenol ส่วนอะตอมของ Zn(II) สร้างพันธะโคออร์ดิเนตโคเวเลนต์กับไนโตรเจน 2 อะตอมซึ่งมาจากไนโตรเจนของวงอิมิดาโซล 1 วง ไนโตรเจนอีก 1 อะตอมจากเอมีนตติยะภูมิ และโคออร์ดิเนตกับออกซิเจน 3 อะตอม

โดย 1 อะตอมของออกซิเจนมาจากหมู่ไฮดรอกซิลของลิแกนด์ H_2L อีกหนึ่งอะตอมของออกซิเจนจากออกซิเจนที่ทำหน้าที่เป็นลิแกนด์สะพาน และ1 อะตอมออกซิเจนของลิแกนด์ จาก 2-[(Bis-pyridin-2 -ylmethyl-amino)-methyl]-6 -{[(2 -hydroxy-benzyl)-(4 -imidazol-1 -yl-butyl)-amino]-methyl}-4-methyl-phenol โดยอะตอมของ Fe(III) มีเลขโคออร์ดิเนชันเท่ากับ 6 รูปทรงทางเรขาคณิตโดยรอบของ Fe(III) เป็นออกตะฮีดรอลบิดเบี้ยว ส่วน Zn(II) มีเลขโคออร์ดิเนชันเท่ากับ 5 รูปทรงทางเรขาคณิตโดยรอบของ Zn(II) จะเป็นพีระมิดฐานสี่เหลี่ยม ส่วนนอกโคออร์ดิเนชันสเฟียร์ประกอบด้วยโมเลกุลของเปอร์คลอเรต 1 โมเลกุลทำหน้าที่เป็นเคาร์เตอร์ไอออน

การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรีย *E. coli* และ *S. aureus*

จากการศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียชนิดแกรมลบได้แก่ *E. coli* และชนิดแกรมบวก ได้แก่ *S. aureus* ที่ระดับความเข้มข้นของสารประกอบเชิงซ้อนที่ 25 mg/10 mL, 50 mg/10 mL และ 100 mg/10 mL ปริมาณของสารตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร พบว่าจากการวัดขนาดของวงใสซึ่งเป็นบริเวณที่มีการยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรียที่ความเข้มข้นดังกล่าวสารตั้งต้นและสารประกอบเชิงซ้อนทั้งหมดมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียทั้งชนิดแกรมบวกและแกรมลบ โดยเมื่อเรียงลำดับประสิทธิภาพเป็นดังนี้ 2,6-bis(chloromethyl)-4-methyl phenol < 2,2'-Dipicolamine < 2-[(3-pyrazol-1-yl-propylamino)-methyl]-phenol < H_2L < สารประกอบเชิงซ้อน **1** ≈ สารประกอบเชิงซ้อน **2** ในแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด และความเข้มข้นของสารประกอบเชิงซ้อนยิ่งมากขึ้น การยับยั้งการเติบโตของเชื้อแบคทีเรียก็จะสูงขึ้นเช่นกัน ดังนั้นปริมาณของสารประกอบเชิงซ้อนจะแปรผันตรงกับขนาดโซนใสในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียดังกล่าว และเมื่อศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเทียบกับลิแกนด์อิสระพบว่าสารประกอบเชิงซ้อนมีฤทธิ์ในการยับยั้งที่ดีกว่าเมื่อใช้ที่ความเข้มข้นเดียวกันเมื่อเปรียบเทียบกับตัวควบคุม ในกรณีนี้ใช้ตัวทำละลายและตัวควบคุมเป็นเมทานอล พบว่าตัวทำละลายไม่มีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย โดยจากงานวิจัยหลายๆงานวิจัยพบว่าสาเหตุที่สารประกอบเชิงซ้อนมีฤทธิ์ในการยับยั้งดีกว่าลิแกนด์อันเนื่องมาจากผลของการเกิดคีเลตของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างอะตอมของโลหะแทรนซิชันกับลิแกนด์ที่ทำให้ความมีขั้วของอะตอมโลหะแทรนซิชันลดน้อยลง เนื่องจากประจุบวกบางส่วนถูกใช้ร่วมกับหมู่ให้อิเล็กตรอนของลิแกนด์เพื่อสร้างพันธะโคออร์ดิเนตโคเวเลนซ์และอิเล็กตรอนบางส่วนเกิดการเคลื่อนย้ายภายในวงทำให้อะตอมของโลหะแทรนซิชันที่อยู่ตรงกลางเกิดความไม่มีขั้วเพิ่มขึ้น จึงช่วยให้เกิดการแทรกซึมเข้าไปยังชั้นไขมันของผนังเซลล์แบคทีเรียได้ ส่งผลให้แบคทีเรียไม่สามารถนำสารอาหารที่อยู่ภายในตัวไปใช้ประโยชน์ได้ ทำให้การเจริญเติบโตของแบคทีเรียหยุดชะงัก (Ashu C. 2002 : 203) และตายในที่สุด ซึ่งเมื่อศึกษาจากผนังเซลล์แบคทีเรียทั้งสองชนิด

พบว่า ผนังเซลล์ของ *E. coli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบมีขนาดของผนังเซลล์เท่ากับ 10 นาโนเมตร ส่วนผนังเซลล์ของ *S. aureus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกมีขนาดผนังเซลล์เท่ากับ 20-80 นาโนเมตร ซึ่งจากเหตุผลดังกล่าวทำให้ผลจากการทดลองฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย พบว่าสารประกอบเชิงซ้อนทั้ง 2 ชนิด มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียชนิดแกรมลบดีกว่าแบคทีเรียชนิดแกรมบวก เนื่องจากขนาดของความหนาของผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบน้อยกว่าขนาดความหนาของแบคทีเรียชนิดแกรมบวกจึงทำให้การแทรกซึมของสารประกอบเชิงซ้อนเข้าไปยังชั้นไขมันของผนังเซลล์แบคทีเรียมีการแทรกซึมได้ดีกว่า

ข้อเสนอแนะ

1. ควรระมัดระวังในระหว่างที่โซเดียมเปอร์คลอริก ($NaClO_4$) เนื่องจากสารชนิดนี้สามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิไดส์กับลิแกนด์อินทรีย์ อาจจะทำให้เกิดการระเบิด หรือกระเด็นโดนร่างกายได้
2. นำโลหะแทรนซิชันชนิดอื่น ๆ เช่น ทองแดง(II) โคบอลต์(II) ใช้เป็นสารตั้งต้น เป็นต้น
3. ในกรณีที่สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กและสังกะสีกับลิแกนด์มัลติเดนเตตที่สังเคราะห์ได้ไม่สามารถตกผลึกในตัวทำละลายที่เหมาะสมใหม่ การพิสูจน์เอกลักษณ์โครงสร้างเพื่อยืนยันข้อมูลให้ถูกต้อง ควรนำสารดังกล่าวไปวิเคราะห์เพื่อหาเปอร์เซ็นต์ของธาตุคาร์บอน ไฮโดรเจน ไนโตรเจน และออกซิเจน

บรรณานุกรม

ฉัตรชัย ศรชัย และ พิมพ์พันธุ์ เลียงพิบูลย์. (2529). คู่มือปฏิบัติการ วิชา Medical Bacteriology. กรุงเทพมหานคร : มหาวิทยาลัยมหิดล.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ. (2541). จุลชีววิทยาทั่วไป. กรุงเทพมหานคร : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

นิติพงษ์ ศิริวงศ์ และ เอกชัย ชูเกียรติโรจน์. (2552). "การดื้อยาปฏิชีวนะของ *Staphylococcus aureus* และแนวทางควบคุม," สงขลานครินทร์เวชสาร. 22(4), 347-358.

บุษกร อุตรภิชาต. (2549). ปฏิบัติการจุลชีววิทยา. สงขลา : มหาวิทยาลัยทักษิณ.

วิไลวรรณ ปานช่วย. (2549). ประสิทธิภาพของสารสกัดจากข่อยในการยับยั้งเชื้อ *Salmonella typhimurium, Shigella dysenteriae* และ *Escherichia coli.* โครงการวิจัยทางชีววิทยา วิทยาศาสตรบัณฑิต. สงขลา : มหาวิทยาลัยทักษิณ.

เสน่ห์ แก้วนพรัตน์. (2546). คู่มือปฏิบัติการ วิชา 580-573 จุลชีววิทยาทางเทคโนโลยีเภสัชกรรม. สงขลา : มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อมรรัตน์ สีสุกอง, กัลยาภรณ์ จันตรี, ศรีสุดา หาญภาคภูมิ, นาฏลดา อ่อนวิมล และ ทิฐิมา นวลบุญ. (2550). การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากวัชพืชท้องถิ่นในจังหวัดนนทบุรี. โครงงานวิจัยทางชีววิทยา วิทยาศาสตรบัณฑิต. กรุงเทพมหานคร : มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต.

Anob, K., Rebecca, B., Sarah, J. S., Gerhard, S and Lawrence, R. G. (2011). "Phosphate ester cleavage promoted by a tetrameric iron(III) complex", J Biol Inorg Chem. 16, 25-32.

Athanassios K. B., Robyn E. A., Sarah J. S., Ruth E. M., Mark J. R.,Gerhard S., Allan G. B., Lyall R. H. and Lawrence R. G. "Synthesis and characterization of the tetranuclear iron(III) complex of a new asymmetric multidentate ligand. A structural model for purple acid phosphatases". Dalton Trans. 2007, 5132–5139.

Ashu, C., Ratan, S. and Singh R. (2002). "Tetraazamacrocyclic complexes of tin(II) : synthesis spectroscopy and biological screening," Journal of the Chilean Chemical Society. 47(3), 203-211.

Buchholz, R. R., Etienne, M. E., Dorgelo, A., Mirams, R. E., Smith, S. J., Chow S. Y., Hanton, L. R., Jameson, G. B. Schenk and G., Gahan, L. R. (2008). A structural and catalytic model for zinc phosphoesterases. Dalton Trans. 6045 – 6054.

Gao, F., Yang, P., Xie, J. and Wang H. (1995). Synthesis, Characterization and Antibacterial Activity of Novel Fe(III), Co(II), and Zn(II) Complexes with Norfloxacin., Journal of Inorganic Biochemistry, 60, 61-67.

Guddat, L.W., McAlpine, A. S., Hume, D., Hamilton, S., de Jersey, J. and Martin, J. L. (1999). Crystal structure of mammalian purple acid phosphatase. Structure, 7(7), 757-767.

Horn, A., Neves, A., Bortoluzzi, A. J., Drago, V. and Ortiz, W.A. (2001). Crystal structure and magnetic properties of a new tetranuclear iron(III) complex with asymmetric iron coordination as a model for polynuclear iron proteins, Inorganic Chemistry Communication. 4, 173-176.

Huang, M., Xie, Sheng-Xue, Ma, Ze-Qiang, Hanzlik, Robert P. and Ye, Qi-Zhuang. (2006). Metal mediated inhibition of methionine aminopeptidase by quinolinyl sulfonamides, Biochemical and Biophysical Research Communication. 339, 506-513.

Neves, A. and de Brito, M.A. (1996). FeIIIFeIIand FeIIFeIIIcomplexes as synthetic analogues for the oxidized and reduced forms of purple acid phosphatases. Inorganic Chemistry., 35, 2360-2368.

Smith, S. J., Noble, C. J., Palmer, R. C., Hanson, G. R., Schenk, G., Gahan, L. R. and Riley, M. J. (2008). Structural and spectroscopic studies of a model for catechol oxidase. Journal of Biological Inorganic Chemistry., 13(4), 499-510.

Sönmez, M., Celebi, M., Berber, I. (2010). Symthesis, spectroscopic and biological studies on the new symmetric Schiff base derived from 2,6-diformyl-4-methylphenol with N-aminopyrimidine, European Journal of Medicinal Chemistry., 45, 1935-1940.

Tavman, A., Ikiz, S., Bagcigi, F, A., Ozgur, N, Y., Ak, S. (2009). "Synthesis, characterization, and antibacterial effect of 4-methoxy-2-(5-H / Me / Cl /NO_2 -1H-benzimidazol-2-yl)-phenols and some transition metal complexes. Turk J Chem., 33: 321-331.

Trukhan, V. M., Gritsenko, O. N., Nordlander, E. and Shteinman, A. A. (2000). Design and synthesis of new models for diiron biosites. Journal of Inorganic Biochemistry. 79, 41-46.

Twitchett, M.B. and Sykes, A.G. (1999). Structure, Properties and reactivity of the Fe(II)Fe(III) and Zn(II)Fe(III) purple acid phosphatases. European Journal of Inorganic Chemistry. 12, 2105-2115.

Twitchett, M.B., Schenk, G., Aquino, M. A. S., Yiu, D., Lau, T-C. and Sykes, A.G. (2002). Reactivity of M(II) metal-substituted derivatives of pig purple acid phosphatase (uteroferrin) with phosphate. Inorganic Chemistry. 41, 5787-5794.

Xavier, F. R., Neves, A., Casellato, A., Peralta, R. A., Bortoluzzi, A. J., Szpoganicz, B., Severino, P. C., Terenzi, H., Tomkowicz, Z., Ostrovsky, S., Haase, W., Ozarowski, A., Krzystek, J., Telser, J., Schenk, G., Gahan, L. R.(2009). Unsymmetrical Fe(III)Co(II) and Ga(III)Co(II) complexes as chemical hydrolases: biomimetic models for purple acid phosphatases (PAPs). Inorganic Chemistry. 48(16), 7905-7921.

Zhou, Z-Yuan., Cai Y., Fang,H-Cai., Zhan,Q-Guang., Jin,H-Jie., Feng,Y-Hui. and Cai,Y-Peng. (2010). Assembly of two low-dimensional coordination polymers from Ag(I) and Cd(II) and 2,3-bis(2-pyridyl)pyrazine. Inorganica Chimica Acta. 363, 877-883.